Experimentelle Chemotherapie von zwei xenotransplantierten humanen Bronchialkarzinomen am Modell der thymusaplastischen Nacktmaus

– Kleinzelliges Bronchialkarzinom B 1 –

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Annette Spieth

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene an der

Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. med. H.-W. Schlipköter)

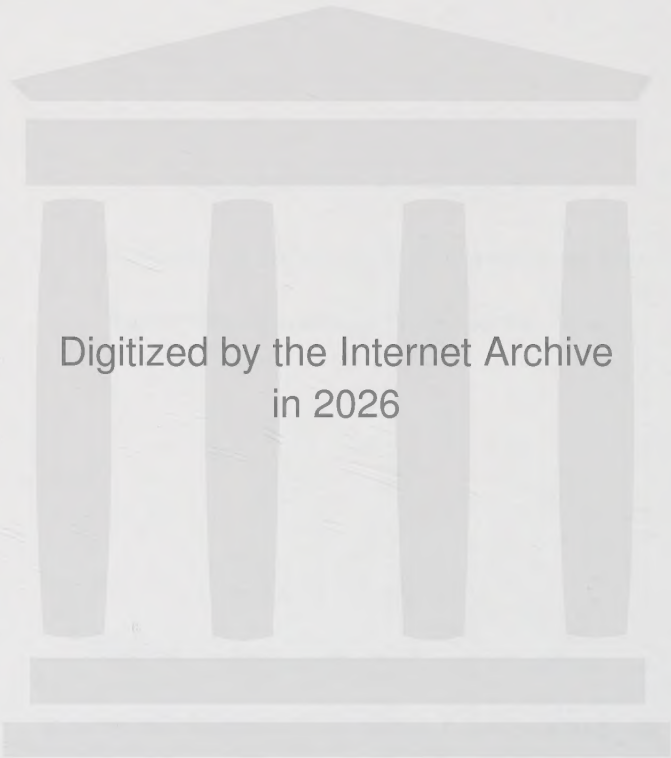
Experimentelle Chemotherapie von zwei xenotransplantierten humanen Bronchialkarzinomen am Modell der thymusaplastischen Nacktmaus

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Markus Klopf
Annette Spieth
1983


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0065

Meinen Eltern in Dankbarkeit

M. K.

Meinem Großvater Eugen Spieth, dem ich die Beendigung meines Studiums verdanke

A. S.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. Schlipköter

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Bojar

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
1.1	Historisches über die experimentelle Onkologie	1
1.2.	Die thymusaplastische Nacktmaus als Versuchsmodell	2
1.2.1	Genetik	2
1.2.2	Thymusentwicklung	2
1.2.3	Hämatologie und Immunologie	2
1.2.4	Auswirkungen der Thymusaplasie	3
1.2.4.1	Infektanfälligkeit	3
1.2.4.2	Xenotransplantation	3
1.2.4.3	Reaktion des Transplantats	5
1.2.4.4	Reaktion des Wirtsorganismus	6
1.2.5	Rekonstituierung der Thymusfunktion	7
1.2.6	Bedeutung der Nacktmaus in der Onkologie	7
1.2.7	Übertragbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse auf die Humantherapie	8
1.3	Probleme der klinischen Chemotherapie	8
2	Thematik der Arbeit	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Versuchstiere: Herkunft und Haltung	11
3.2	Tumoren	11
3.2.1	Herkunft und Histologie	11
3.2.2	Zellkinetik und Biochemie	11
3.3	Transplantation und Wachstum	13
3.4	Zytostatika	13
3.4.1	Adriblastin	13
3.4.2	Endoxan	14
3.4.3	Lomustin	14
3.4.4	Methotrexat	14
3.4.5	Vincristin	15
3.5	Versuchsdurchführung	15
3.6	Versuchsauswertung	16
3.6.1	Tumorwachstum	16
3.6.2	Zellkinetik	19

4	Ergebnisse und Diskussion	22
4.1	Tumor B13	22
4.1.1	Wachstum	22
4.1.2	Zellkinetik	25
4.2	Tumor B1	32
4.2.1	Wachstum	32
4.2.2	Zellkinetik	35
4.3	Auswertungsmodell	43
5	Zusammenfassung	45
6	Abbildungen	46
6.1	Wachstums- und Zellkinetikkurven Tumor B13	46
6.2	Wachstums- und Zellkinetikkurven Tumor B1	56
7	Liste der verwendeten Abkürzungen	66
8	Literaturverzeichnis	67
9	Lebensläufe	75
10	Danksagung	77

1. Einleitung

1.1 Historisches über die experimentelle Onkologie

Die experimentelle Onkologie sucht ständig nach geeigneten Methoden und Modellen, die die biologischen Verhältnisse des menschlichen Organismus im Versuch möglichst unverfälscht reproduzieren. Sie bemüht sich, im Laborexperiment Therapiekonzepte zu entwickeln, die auf die individuellen Tumorerkrankungen des Menschen abgestimmt sind. Die Zellkultur erbrachte viele Erkenntnisse über den spezifischen Wirkungsmechanismus einzelner Chemotherapeutika und Hinweise auf die Chemosensibilität von Geschwülsten unterschiedlicher Histologie. Jedoch blieb die Korrelation zwischen in-vitro-Test und in-vivo-Therapie unbefriedigend. Die Ursachen für die mangelhafte Übereinstimmung bestehen darin, daß zum einen bei der Etablierung einer Zellinie aus humanem Material bereits eine Selektion bestimmter Zellsubpopulationen stattfindet, zum anderen die Zellen in der Kultur manche ihrer charakteristischen Eigenschaften verändern. Exemplarisch sei der Nachweis von Antigen-Verlusten kultivierter Zellinien erwähnt (12). Es stellt also die Zellkultur nur einen kleinen, unvollständig Ausschnitt aus dem in-vivo-System dar. Da es sich aus ethischen und medizinischen Gründen verbietet, Versuche zur Chemosensibilität von Tumoren am Menschen durchzuführen, suchte man nach geeigneten Tiermodellen. Um die bekannte Abstoßungsreaktion nichtkompatiblen heterogenen Gewebes zu umgehen, wurde menschliches Tumormaterial

a) Versuchstieren an "immunologisch privilegierten Stellen", d.h. solchen mit schwächeren Abwehrreaktionen, implantiert: Backentasche des Hamsters (14), vordere Augenkammer von Nagetieren (37) u.a.;

b) in immunologisch inkompetente Tiere xenotransplantiert: mit hochdosiertem Cortison vorbehandelte Tiere (13); thymektomierte, mit Anti-Lymphozytenserum behandelte und ganzkörperbestrahlte Mäuse (8) und weitere Modifikationen.

Nachteile und somit Gründe für die ausgebliebene routinemäßige Verwendung dieser Tiermodelle liegen in unterschiedlichem Ausmaß in der niedrigen Anwachsrate der Transplantate, dem teilweise nur langsamen Wachstum, der Verfälschung der Ergebnisse durch Cortison und dem manchmal hohen experimentellen Aufwand (67).

ISAACSON und CATTANACH (43) erwähnten 1962 erstmals die Nacktmaus. FLANAGAN beschrieb 1966 den genetischen Hintergrund der Mutante, die PANTELOURIS 1968 als "kongenital-thymusaplastisch" charakterisierte (23, 63).

RYGAARD und POVLSEN publizierten 1969 einen Bericht über die erste erfolgreiche Transplantation eines menschlichen Kolonkarzinoms auf die Nacktmaus (76). Seitdem gewann die thymusaplastische Nacktmaus wachsende Bedeutung als Versuchsmodell in der Onkologie, Immunologie und Parasitologie. Vor einigen Jahren gelang auch die Züchtung thymusaplastischer Nacktvarianten von Ratte und Meerschweinchen. Bedauerlicherweise sind alle Tiere der Meerschweinchenzucht wegen unzureichender Haltungsbedingungen gestorben.

1.2 Die thymusaplastische Nacktmaus als Versuchsmodell

1.2.1 Genetik

Von den zehn Chromosomenpaaren trägt das Chromosom "11" das von FLANAGAN so bezeichnete Gen "nude". Auf diesem ist die Information für die Anlagen "Haarlosigkeit" und "Thymusaplasie" kodiert, die jedoch beide voneinander funktionell unabhängig sind. Das Gen wird autosomal rezessiv vererbt, so daß nur die Homozygoten "nu/nu" die für die Nacktmaus charakteristischen Immundefekte aufweisen (92).

1.2.2 Thymusentwicklung

Die Thymusdrüse entwickelt sich bei der Maus aus der dritten Kiemenbogentasche. Bei der Nacktmaus bricht die Entwicklung zwischen dem 11. und 12. Embryonaltag ab (92). Vom 13. Embryonaltag an ist nur noch ein Thymusrudiment mit fibroblastisch eingekapselten epithelialen Zellnestern nachweisbar. Post partum verfettet auch dieses Rudiment und wandelt sich zusehends zystisch um. Lymphozyten oder Hassal'sche Körperchen fehlen (52).

1.2.3 Hämatologie und Immunologie

Eine Leukopenie mit gegenüber der Normalsmaus ca. 50 % geringeren Leukozytenzahlen wird durch das fast völlige Fehlen der T-Lymphozyten hervorgerufen, die sonst ca. 85 % der Gesamtlymphozytenzahl ausmachen. Die Anzahl der Granulozyten ist dagegen normal (56, 77). Mit immunologischen Methoden läßt sich eine kleine thymusunabhängige Lymphozytensubpopulation nachweisen. Diese Zellen tragen das sogenannte theta-Antigen, das bei Blutzellen spezifisch für T-Lymphozyten ist. Über seine Herkunft und Bedeutung exi-

stieren noch keine klaren Vorstellungen (72). Diese theta-positiven Lymphozyten scheinen neueren Untersuchungen zufolge eine Aufgabe bei der Abwehr von Virusinfektionen zu haben (45). Die IgM-Spiegel sind nach BENNER et. al. (7) leicht erhöht, alle anderen Immunglobulinklassen sind erniedrigt. Andere Autoren berichten abweichend auch von erniedrigten IgM-Titern (52).

1.2.4 Auswirkungen der Thymusaplasie

1.2.4.1 Infektanfälligkeit

Durch das Fehlen der zytotoxischen T-Lymphozyten ist die zelluläre Immunität stark reduziert, nur Natural-Killer-Zellen und Makrophagen erfüllen noch diese Funktion (vgl. 1.2.4.2 und 1.2.4.4). Daraus erklärt sich auch die besonders hohe Infektanfälligkeit konventionell gehaltener Nacktmäuse. Man beobachtet gehäuft Mäusevirushepatitiden, unspezifische aszendierende urogenitale Infektionen, chronische Dickdarmentzündungen mit Rektumprolaps und durch fehlende Wimpern mitverursachte Augenlidabszesse (50). Wegen der unzureichenden körpereigenen Abwehrmechanismen verlaufen diese Infektionen sehr schnell mit einer letal endenden Kachexie. Die mittlere Lebenserwartung beträgt daher nur ca. 3 Monate. Daraus erklärt sich hauptsächlich das sporadische Auftreten von Spontantumoren in konventionell gehaltenen Nacktmäusen (78). Nachdem in der Tierhaltung jedoch SPF-Bedingungen (i.e. specific pathogen free) eingeführt wurden und die Nacktmaus eine der Normalmaus vergleichbare mehrjährige Lebenserwartung erreichte, werden auch vermehrt Spontantumoren beobachtet. Ihre Häufigkeit unterscheidet sich dann nicht mehr von der in normalen Mäusen (76). Spezielle Untersuchungsergebnisse lassen sogar vermuten, daß es durch eine Überstimulation des murinen B-Zell-Systems zu einem gehäuften Auftreten von Lymphomen (64) kommt. Für die Validität von Therapieversuchen sind SPF-Bedingungen sicherlich von Vorteil (31), doch konnten mit verbesserten konventionellen Laborbedingungen (beschrieben von SHIN (83)) ebenfalls gute Resultate erzielt werden.

1.2.4.2 Xenotransplantation

Ihre rasch zunehmende Verbreitung als Versuchstier verdankt die Nacktmaus ihrer thymusaplasiebedingten Fähigkeit, bestimmte xenotransplantierte Gewebe ohne Abstoßungsreaktion anzunehmen. Verschiedene Transplantationstechniken werden durchgeführt:

durch Zellkulturen gewonnenes Material kann ebenso wie fein zerkleinertes Gewebe in unterschiedliche Organe, z.B. Herz, Gehirn, Muskel und Niere oder Körperhöhlen, z.B. Peritonealraum, Uterus, Subkutanraum, injiziert werden. Die Methode der subkutanen Transplantation hat für Therapiestudien die meiste Verbreitung gefunden, weil das Tumorwachstum am besten beobachtet und kontinuierlich gemessen werden kann. Die günstigsten Voraussetzungen für das Wachstum des Xenotransplantats bietet die vordere Region des lateralen Körperstammes, anatomisch gesehen die vordere Milchleiste relativ junger Tiere (3,18, Abb.1: Zur besseren Demonstration ist eine Nacktmaus abgebildet, der zwei Tumoren in die linke Flanke implantiert wurden). Auf der Maus wachsen gutartige Gewebe wie z.B. Hauttransplantate von Mensch und Ratte, verschiedene Organtransplantate von Nagern, Reptilien und Vögeln (73). Es wird aber auch berichtet, daß benigne Zellinien in der Maus kein oder nur geringes Wachstum zeigen und sich nicht passagieren lassen (48, 100). Einige Autoren empfehlen die Nacktmaus daher als Modell zur Testung der Tumorigenität und Onkogenität von Zellen (5,84). Größtes Interesse findet jedoch das Wachstum bösartiger Tumoren auf der Nacktmaus.

Abb. 1: thymusaplastische Nacktmaus mit subkutan wachsenden Xenotransplantaten in der linken Milchleiste

Die Angehrate menschlicher Malignome differiert in Abhängigkeit von Histologie, Differenzierungsgrad, Transplantatbeschaffenheit und -menge und noch unbekannten Faktoren erheblich. FOGH et al. (27) und POVLSEN (70) berichten in Zusammenfassungen ihrer Transplantationsergebnisse:

a) die höchsten Angehraten mit bis zu 25 % zeigen Melanome, Kolon- und Lungenkarzinome,
b) die geringsten Angehraten mit ca. 8 % finden sich bei Mamma- und Lymphoretikulartumoren,
c) wenig differenzierte Tumoren, Tumorrezidive und Metastasen wachsen besser an als hochdifferenzierte Tumoren und Primärtumoren. Bisher bestehen hierfür nur hypothetische Erklärungsversuche.

Bei der Angehrate konnte eine Abhängigkeit von der Zahl der transplantierten Zellen gezeigt werden, deren Minimum für verschiedene Tumoren zwischen 10^4 bis 10^5 Zellen liegt (48, 84). Von Bedeutung ist auch der Transplantationsmodus, da subkutan implantierte Gewebestückchen wesentlich besser anwachsen als injizierte Zellsuspensionen. Außerdem verfügt die Nacktmaus über ein T-lymphozytenunabhängiges Abwehrsystem, das mit dem Transplantatwachstum interferieren kann. Natural-Killer-Zellen und Makrophagen sind daran beteiligt (86). Für die Makrophagen ist sogar eine gegenüber der Normalmaus gesteigerte Aktivität bei der Tumorzellzerstörung und Infektabwehr nachgewiesen (80).

1.2.4.3 Reaktion des Transplantats

Entscheidend für die Verwendung des Nacktmausmodells in der Onkologie ist die Frage, ob das Xenotransplantat auch nach mehreren Tierpassagen alle Eigenschaften des implantierten menschlichen Gewebes beibehält.
In der Literatur finden sich zahlreiche Publikationen zu diesem Problem. So konnte belegt werden, daß jeder Tumor eine für ihn typische Latenzzeit bis zum makroskopisch sichtbaren Wachstum hat (38). Die Tumorverdoppelungszeit wird mit der Anzahl der Tierpassagen bis zu einem Limit kürzer (57, 62), jedoch sind dann das Wachstumsverhalten (66, 68) und die Latenzzeit in Abhängigkeit von der implantierten Zellzahl konstant (31, 84). Licht- (53, 69, 70, 88) und elektronenmikroskopische Untersuchungen (33, 87) beweisen, daß das histopathologische Bild des Xenotransplantats dem des Originärtumors gleicht. Es wird nur eine mäßige murine Stromainvasion beobachtet (87), das Tumorstroma selbst scheint mit zunehmender Passagierung abzunehmen (81, 91). Hinsichtlich der Ausdifferenzierung des Gewebes sind

unterschiedliche Resultate veröffentlicht worden (11, 35). Chromosomenanalysen zeigen eindeutig, daß der menschliche Karyotyp auch nach Langzeitpassagen erhalten bleibt (6, 28, 34, 68, 69, 91). Mit immunologischen Verfahren wurde nachgewiesen, daß die Enzymmuster der G-6-PD und der LDH konstant sind, aber auch eine Hybridisierung von menschlichen und murinen Zellen möglich ist (90, 93).
Das CEA bleibt in allen Passagen nachweisbar, zeigt allerdings variable Titer (88, 91). Eine originäre Muzin- (70, eigene Resultate) und Hormonproduktion (81) wird auch im Transplantat beibehalten. Die Antigenstruktur der humanen Zellen ist unverändert (28, 53, 95, 101). In zytokinetischen Studien ist eine Erhöhung des Mitoseindex festgestellt worden, die bei aus Metastasen gewonnenen Xenotransplantaten geringgradiger ausgeprägt ist als bei aus Primärtumoren gewonnenen. Der H_3-Markierungs- und der Mitoseindex stehen aber immer in einem konstanten Verhältnis zum Originärtumor (53, 79). In der Nacktmaus wurden anfänglich überhaupt keine Metastasen beschrieben. Doch bei eingehenderen Untersuchungen beobachtete man selten Metastasen des Xenotransplantats (2, 34, 51). Ursächlich werden folgende Möglichkeiten diskutiert:

a) die am häufigsten durchgeführte subkutane Implantation ist sehr ungünstig für die Disseminierung der Tumorzellen (33),
b) der Beobachtungszeitraum der Maus ist zu kurz (32) und
c) T-zellunabhängige Abwehrmechanismen, z.B. NK-Zellen (86) verhindern eine Metastasierung.

Mittlerweile sind Neoplasmen beschrieben worden, die als Xenotransplantate wegen ihrer regelmäßigen Metastasierung in der Nacktmaus Modellcharakter für das Studium von Tumormetastasen gewonnen haben (9, 27).

1.2.4.4 Reaktion des Wirtsorganismus

Die nutritive Versorgung des Transplantats erfolgt über eine vom Empfängerorganismus aufgebaute Vaskularisation (siehe Abb. 1, S. 4: über dem caudal gewachsenen Tumor sind Gefäßverläufe deutlich erkennbar). Kann die Gefäßversorgung dem Tumorwachstum nicht mehr in ausreichendem Maße folgen, kommt es zur Nekrosen- und Zystenbildung der entsprechenden Gewebeabschnitte. In den allermeisten Fällen werden die Tumoren durch eine fibröse Bindegewebsschicht vom Mausgewebe abgekapselt. Nur selten wird über ein infiltrierendes Transplantatwachstum berichtet. Geringe Gewebeinfiltrationen

der Tumoren mit Makrophagen, Mastzellen, NK-Zellen und B-Lymphozyten stellen eine vorrangig unspezifische Reaktion des Wirtsorganismus gegen Zellzerfallsprodukte, weniger eine spezifische Transplantatabstoßung dar (66, 84, 100). Neueste Forschungsergebnisse berichten jedoch über neoplastisches Wachstum von infiltrierenden Mäusestromazellen in sehr hohen Tierpassagen (90, 93, vgl. 1.2.7).

1.2.5 Rekonstituierung der Thymusfunktion

Verschiedene Experimente werden beschrieben, mit denen es gelingt, die thymusabhängigen Immunmechanismen der Nacktmaus zu normalisieren. So beobachtet man nach Implantation bestrahlten neonatalen Thymusgewebes unter die Nierenkapsel einen Anstieg der Zahl sogenannter C-Ig-Zellen, die für die Synthese von Serum-IgG und IgA verantwortlich sind (7).
Ebenso tritt bei zuvor erfolgreich xenotransplantierten Tumoren nach Implantation neonatalen Thymusgewebes in den Empfängerorganismus eine klassische dreiphasige Abstoßungsreaktion auf (44). Die Injektion normaler Thymozyten stellt die Funktion von "Suppressor"- und "Helfer"-T-Zellen wieder her (40).

1.2.6 Bedeutung der Nacktmaus in der Onkologie

Die Nacktmaus verfügt über einzigartige Eigenschaften, die sie als hervorragendes Tiermodell prädestinieren.

1. solide menschliche Tumoren werden ohne immunsuppressive Vorbehandlung in ausreichender Anzahl von der Maus als Transplantat akzeptiert,
2. die Tumoren können über lange Zeit passagiert werden,
3. sie haben ein konstantes und vorhersagbares Wachstumsverhalten, das mit einfachen Mitteln meßbar ist,
4. das menschliche Gewebe behält seine individuellen biologischen Charakteristika bei und steht in hinreichender Menge für Experimente zur Verfügung,
5. die SPF-Haltung der Nacktmaus erlaubt ausgedehnte Langzeitstudien, (modifiziert nach (69)) und
6. die tumorspezifische Chemosensibilität bleibt auch nach Serientransplantation erhalten (67, 62).

Daher eignet sich die thymusaplastische Nacktmaus zur Suche und Testung neuer Chemotherapeutika vor der klinischen Erprobung. Wahrscheinlich wird

die Auswahl eines Therapiekonzepts für die zytostatische Behandlung individueller humaner Malignome verbessert. Nicht zuletzt kann auch die Effektivität anderer Therapieformen aus der Endokrinologie, Immunologie und Strahlentherapie beobachtet werden.

1.2.7 Übertragbarkeit tierexperimentieller Ergebnisse auf die Humantherapie

Für die klinische Wertigkeit des Nacktmausmodells ist die Übertragbarkeit der experimentell gefundenen Ergebnisse auf die Humantherapie von ausschlaggebender Bedeutung. Mittlerweile liegen Studien vor, die von einer sehr guten Korrelation zwischen klinischen und tierexperimentellen Therapieerfolgen berichten. Häufiger wird zwar noch retrospektiv ein am Tumorpatienten wirksames Zytostatikum im Nacktmaustransplantat auf seinen Effekt untersucht (17, 25, 26, 29, 30, 49). Aber auch erste Arbeiten, die eine experimentell gefundene Zytostatikatherapie auf den Patienten übertragen, sind mit erfolgversprechenden Ergebnissen publiziert (4, 23, 85). Dennoch stellt das Nacktmausmodell kein biologisch inertes System dar. Die Thymusaplasie erlaubt wohl bisher einmalige Versuchsanordnungen in Onkologie und Immunologie. Es darf aber nicht übersehen werden, daß auch die Nacktmaus über ihre verbliebenen Immunmechanismen (vgl. 1.2.4.2 und 1.2.4.4) das transplantierte Gewebe beeinflussen kann. Insbesondere Tumoren in sehr hohen Tierpassagen zeigen gelegentlich murine Stromainfiltrationen mit Zellhybridisierungen und sarkomatöser Entartung von Fibroblasten (90, 93).

1.3 Probleme der klinischen Chemotherapie

In den letzten Jahren erreichte in der Klinik die Chemotherapie bei der Behandlung menschlicher Malignome neben der chirurgischen und radiologischen Therapie einen gleichbedeutenden Stellenwert. Vielfältige Therapieschemata wurden durch klinisch-statistische Untersuchungen, in vitro-Experimente und über die Verwendung von Tiertumoren erarbeitet, die eine menschlichen Malignomen vergleichbare histologische Klassifikation aufwiesen. Hinsichtlich Zusammenstellung und Dosis, Applikationsart und -dauer sind die unterschiedlichsten Variationen geläufig. Bei soliden Tumoren finden diese zumeist als adjuvante oder palliative Chemotherapie Anwendung, nur selten wird ein primär kurativer Erfolg angestrebt. Bisher wird die Möglichkeit einer erfolgreichen Anwendung einer Zytostatika- oder Radiotherapie nach der Histologie des Malignoms abgeschätzt. Plattenepithelkarzinome gelten als relativ

strahlensensibel, kleinzellige Bronchialkarzinome oder Chorionepitheliome als zytostatikasensibel. Diese Einteilung ist sicherlich in umfangreichen Studien im allgemeinen gültig. Bei der individuellen Behandlung der Patienten jedoch macht der Kliniker die Erfahrung, daß vor Beginn einer Chemotherapie deren Erfolg kaum vorausgesagt werden kann (20). Die Lebenserwartung ist manchmal nur unwesentlich verlängert, aber verbunden mit einem spürbaren Absinken der Lebensqualität. Bisweilen wurde deshalb sehr kritisch die Frage gestellt, woran letztlich der Patient verstirbt, ob am Malignom selbst oder an den Folgen einer aggressiven Chemotherapie.

2. Thematik der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir an einem xenotransplantierten, hochdifferenzierten Adenokarzionom der Lunge und an einem kleinzelligen Bronchialkarzinom die Wirkung der Zytostatika Adriblastin, Endoxan, Lomustin, Methotrexat und Vincristin auf das Wachstum und die Zellkinetik dieser Tumoren. Die verwendeten Zytostatika sind klinisch erprobte Vertreter aus fünf pharmakologisch unterschiedlichen Substanzklassen. Das Wachstumsverhalten, der Mitoseindex und das Verhältnis von Prophasen zu Meta-, Ana- und Telophasen, das sogenannte Mitosephasenverhältnis, wurden bestimmt. Wir entwickelten ein mathematisches Verfahren, um tierindividuell bedingte Wachstumsunterschiede zu korrigieren und eine Funktion aufzustellen, die das allgemeine Wachstumsverhalten der untersuchten Tumoren beschreibt. Die Ergebnisse von Tumorwachstum und Zellkinetik wurden mit statistischen Methoden analysiert und auf ihre Signifikanz getestet. In einem Vergleich der untersuchten Parameter diskutierten wir die Möglichkeiten einer klinischen Therapierbarkeit dieser Tumoren, auch unter Berücksichtigung einer Zellsynchronisation in bestimmten Mitosephasen.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere: Herkunft und Haltung

Zur Versuchsdurchführung verwendeten wir 5-8 Wochen alte NMRI-Mäuse beiderlei Geschlechts, die wir von der Tierversuchsanlage der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen haben. Nach den von SHIN (83) beschriebenen Bedingungen wurden die Tiere in autoklavierten Käfigen in einem separaten Raum mit UV-Schleuse gehalten. Der Zutritt weniger Personen war auf das unbedingt notwendige Maß beschränkt. Es wurde nur mit Mundschutz, sterilen Kitteln, Handschuhen und Instrumenten gearbeitet.
Die Mäuse erhielten "ad libidum" handelsübliches Trockenfutter und eine mit Antibiotika angereicherte Trinkdiät folgender Zusammensetzung: in 1 l entmineralisierten H_2O wurden 0,3g Ampicillin, 0,2g Dicloxacillin, 0,6g Cephalexin und 0,3 g Oxytetracyklin mit einer Multivitaminmischung gelöst und anschliessend 15 ml 1n HCL zugegeben.

3.2 Tumoren

3.2.1 Herkunft und Histologie:

Wir untersuchten zwei Bronchialkarzinome unterschiedlicher Histologie, die beide als Resektionspräparate aus der Klinik vorlagen und in Nacktmäusen etabliert worden waren.

1. Tumor B1: ein kleinzelliges, entdifferenziertes Bronchialkarzionom mit gering ausgeprägten Stromasepten (Abb.2, S. 12)
2. Tumor B13: ein hochdifferenziertes, azinär wachsendes Adenokarzinom der Lunge mit histochemisch nachweisbarer Muzinproduktion (Abb. 3, S. 12)

3.2.2 Zellkinetik und Biochemie

Von STARK (91) wurde mit radio- und enzymimmunologischen Methoden CEA, ACTH und Calcitonin in beiden Tumoren nachgewiesen. Nach etwa zehn Tierpassagen ist der CEA-Wert des Tumors B13 konstant um den Faktor 9 größer als der des Tumors B1: 8600 ng/g Gewebe B13, 1000 ng/g Gewebe B1.
Genau gegensätzlich verhalten sich die ACTH-Werte:
10000 pg/g Gewebe B1, 1500 pg/g Gewebe B13.

Abb. 2: kleinzelliges Bronchialkarzinom B1, Vergrößerung ca. 800 x

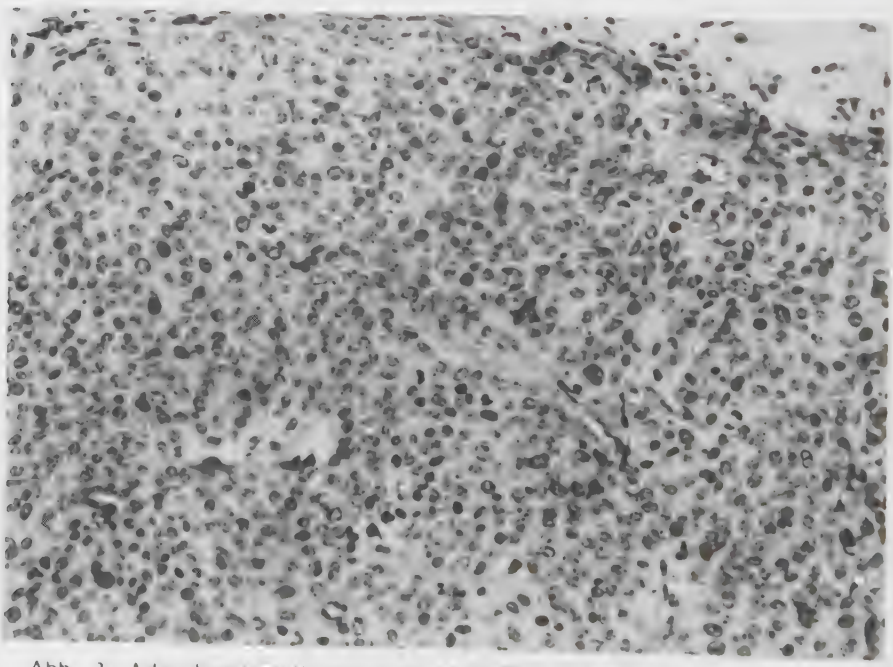


Abb. 3: Adenokarzinom/Lunge B13, Vergrößerung ca. 430 x

Eine Korrelation der CEA- und ACTH-Produktion mit dem Tumorwachstum besteht nicht.
THOR et al. (97) berichteten über Doppelmarkierungsversuche an diesen Tumoren. Dabei stellten sie fest, daß beide Tumoren aus verschiedenen Zellsubpopulationen mit unterschiedlich langen S-Phasen bestehen.

3.3 Transplantation und Wachstum

Das nach mehrfacher Passagierung gewonnene Tumormaterial zerkleinerten wir mit einem Skalpell in Partikel von etwa 1 mm Kantenlänge. Unter Äthernarkose implantierten wir diese nach Inzisionen in beiden Falnken in die Gegend der vorderen Milchleiste der Tiere. Der Wundverschluß erfolgte mit dem Gewebekleber Histoacryl blau^{R} (Fa. Braun Melsungen AG). Sobald makroskopisch ein Wachstum der Transplantate feststellbar war, wurde mit einer Schublehre der größte (D_{max}) und kleinste (D_{min}) Durchmesser der Tumoren in regelmäßigen Abständen bestimmt.

3.4 Zytostatika

Die von uns zur Therapie verwandten Zytostatika werden kurz beschrieben hinsichtlich der Klassifzierung, des pharmakologischen Angriffspunkts und -mechanismus, der Indikationen, der spezifischen Nebenwirkungen und unserer Dosierung im Vergleich mit der in der Literatur angegebenen.

3.4.1 Adriblastin

Adriblastin (ADR) ist ein Antibiotikum aus der Anthracyclin-Gruppe. In der S- und G_2-Phase beeinflußt es die Nukleinsäuresynthese und die mitotische Aktivität durch die Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Synthese. Chromosomale Aberrationen werden beobachtet. ADR wird durch Leber und Niere ausgeschieden und durchdringt nicht die Blut-Hirnschranke. Es ist indiziert bei verschiedenen soliden Tumoren und lymphogranulomatösen Erkrankungen. Neben den bekannten allgemeinen zytostatischen Nebenwirkungen wie Alopezie, Stomatitis und Vomitus ist die hohe Kardiotoxizität zu erwähnen. Sie äußert sich in schweren EKG-Veränderungen und den Zeichen einer Kardiomyopathie (1, 15, 60).
In eigenen Versuchen ermittelten wir eine LD_{50} von 5 mg/kg (i.e.: Dosis, an der 50 % der Versuchstiere versterben). Wie allgemein üblich (42, 78) inji-

zierten wir 20 % der LD_{50}, d.h. 1 mg/kg KG i.p. (KG = Körpergewicht) als Therapiedosis.
In der Literatur finden sich Angaben von 1-5 mg/kg KG (11, 82 u.a.).

3.4.2 Endoxan

Endoxan (END) ist ein synthetisch hergestelltes Alkylans. Es hat einen bifunktionellen Angriffspunkt in der G_2- und S-Phase. Es werden auch andere Mechanismen diskutiert wie Hemmung des Chromatinumbaus und Erzeugung eines prämitotischen Blocks. Nach Applikation wird END durch ein mikrosomales Enzymsystem der Leber aktiviert und hauptsächlich durch die Niere ausgeschieden. Angewandt wird END bei Lymphoblastosen, soliden Tumoren und Autoimmunkrankheiten. Eine spezifische Nebenwirkung ist die hämorrhagische Zystitis mit vital bedrohlichen Blutungen (15, 21, 60). Unsere experimentell gefundene LD_{50} betrug 475 mg/kg KG i.p. Wir injizierten 95 mg/kg KG i.p. Die Literaturangaben schwanken von 25 bis 300 mg/kg KG (11, 53, 71).

3.4.3 Lomustin

Das Medikament Lomustin (CCNU), das zur Gruppe der Nitrosoharnstoffe gehört, ist auf dem deutschen Arzneimittelmarkt nicht zugelassen und wird über Import bezogen. Dieses Zytostatikum zeigt hinsichtlich seines Angriffspunktes keine Phasenspezifität im Zellzyklus. Es wirkt alkylierend, carbamolysierend und inhibierend auf DNA-Repair-Vorgänge. Auch in der sonst therapeutisch kaum angehbaren G_0-Phase ist CCNU zytozid. Da die Substanz lipophil ist, wird sie enteral resorbiert und durchdringt gut die Blut-Hirnschranke. Die Ausscheidung erfolgt vorwiegend über die Niere. Indikationen sind Bronchialkarzinome und ZNS-Tumoren; auch bei Versagen anderer Zytostatika kann es noch erfolgreich eingesetzt werden. CCNU ist stark myelotoxisch (15, 16). Wir gaben 75 mg/kg KG oral, was der Hälfte der vom Hersteller angegebenen Dosis in der Humanmedizin entspricht. In der Literatur werden Dosen von 7,5 bis 40 mg/kg KG i.p. beschrieben (11, 67, 69).

3.4.4 Methotrexat

Methotrexat (MTX) hemmt als sogenannter "Folsäureantagonist" kompetitiv das Enzym "Dihydrofolat-Reduktase" und damit die Bildung der stoffwechsel-

aktiven Tetrahydrofolsäure. Über eine Verarmung der Zellen an DNA, RNA und Proteinen greift MTX in der S-Phase an. Als spezifisches Antidot steht Folinsäure zur Verfügung. MTX wird in den parenchymatösen Organen Milz, Leber und Nieren angereichert und renal eliminiert. Hochdosiert ist es auch liquorgängig. Angewandt wird es beim Bronchialkarzinom und bei gynäkologischen Tumoren. MTX kann zu renal-tubulären und akuten hepatischen Nekrosen führen (90, 91, 123)). Unsere experimentell bestimmte Therapiedosis von 20 % LD_{50} = 1,4 mg/kg KG i.p. ist vergleichbar mit den publizierten Werten von 0,65 - 4 mg/kg KG i.p. (41, 69, 82).

3.4.5 Vincristin

Vincristin (VCR) ist ein Pflanzenalkaloid, das als Spindelgift zu einer reversiblen Mitosehemmung in der Metaphase führt. Neben diesem stathmokinetischen Effekt ist auch ein inhibierender Einfluß auf die DNA-Synthese in der S-Phase nachgewiesen. VCR ist nicht liquorgängig und wird über die Galle mit den Faeces ausgeschieden. Es reichert sich stark in Milz, Schilddrüse und Darm an. Indiziert ist es bei leukämischen Erkrankungen und Sarkomen. Spezifische Nebenwirkungen sind Störungen der neuromuskulären Erregbarkeit wie Parästhesien, Reflex- und Muskelschwund. Die von uns applizierte Dosis von 1/5 LD_5 = 0,2 mg/kg KG i.p. deckt sich mit den Angaben des Präparateherstellers (99) von 0,06 - 0,35 mg/kg KG für Versuchsmäuse. In der Literatur finden sich Dosen von 0,46 - 2 mg/kg KG i.p. (15, 60).

3.5 Versuchsdurchführung

Unter fortlaufender Wachstumsmessung aller Tumoren begannen wir mit der Zytostatikatherapie, wenn die Tumoren eine durchschnittliche Größe von 1 x 0,6 cm^2 erreicht hatten. Infolge variabler Latenzzeiten waren nach 20-30 Tagen die Transplantate des Tumors B1 auf diese Größe angewachsen. Bei dem Tumor B13 wurde bei fast gleichlangen Latenzen um den 25. Tag nach Transplantation jenes Maß erreicht und mit der Therapie begonnen. Die Mäuse wurden nun randomisiert in fünf Therapiegruppen bestehend aus 20-25 Tieren und eine Kontrollgruppe von 10-15 Tieren eingeteilt. Wir verabreichten die unter 3.4 beschriebenen Dosen von ADR, END, MTX, VCR intraperitoneal. Zuerst wurde auch versucht, das nicht wasserlösliche CCNU intraperitoneal zu injizieren. Dabei kam es jedoch bei sehr vielen Tieren zu einer letalen

Darmgangrän mit teilweise freier Perforation. Nach Sektion waren nicht-resorbierte Rückstände des Medikaments als stippchenförmige Auflagerungen im Bauchraum nachweisbar. Deshalb wurde CCNU in Arachisöl gelöst und die angegebene Dosis über einen Magenschlauch instilliert. Die Kontrolltiere erhielten adaequate Dosen PBS-Puffer i.p. bzw. Arachisöl p.o. Die Injektionen erfolgten am 1. und 8. Tag. Wegen der hohen Sterblichkeit unter Lomustin wurde dieses Zytostatikum bei dem kleinzelligen Bronchialkarzinom B1 nur einmal gegeben. Nach 8, 24 Stunden und 3 Tagen (B13) bzw. 4 Tagen (B1), 7, 14, 21 Tagen wurden je Therapiegruppe 3 - 4 Tiere getötet, die Tumoren entnommen und in 6 % Formalin fixiert. Routinemäßig wurden Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Paraffinschnitte von 4µm Schnittdicke hergestellt. Die Muzinproduktion des Tumors B13 wurde mit einer Astra-Blau-Färbung (74) nachgewiesen. Während der gesamten Versuchsdauer wurden Kontrolltieren ebenfalls Tumoren entnommen und diese in gleicher Weise aufgearbeitet.

3.6 Versuchsauswertung

3.6.1 Tumorwachstum

Für das Wachstum isolierten Gewebes ist charakteristisch, daß nach einer Phase der Adaptation an die Gegebenheiten des Mediums eine exponentielle Zellvermehrung einsetzt. Diese Wachstumsphase wird jedoch zunehmend durch nutritive, räumliche und biologische Probleme beeinträchtigt. Daher entsteht langsam ein Fließgleichgewicht zwischen der Vermehrung und dem Absterben von Zellen, ohne daß es zu einer weiteren absoluten Zunahme der Zellzahl kommt. Gompertz beschreibt für das Tumorwachstum diesen Vorgang mathematisch mit seiner gleichnamigen Funktion (55). In der graphischen Darstellung flacht die exponentielle Größenzunahme immer mehr ab und nähert sich asymptotisch einer Abszissenparallelen. In vorbereitenden Langzeitmessungen des Tumorwachstums konnten wir die exponentiellen Wachstumsbereiche der Karzinome B1 und B13 abschätzen. Daher ist gewährleistet, daß bei unserer Versuchsdurchführung das Tumorwachstum eindeutig während der exponentiellen Phase gemessen wurde. Da sich Exponentialfunktionen in semilogarithmischer Darstellung als Geraden zeichnen lassen, wählten wir dieses Verfahren zur einfacheren Datenaufbereitung.
Aus der unmittelbaren Beobachtung läßt sich ersehen, daß der wachsende Tumor annähernd die ellipsenförmige Fläche A* einnimmt. Als Maß für das Tumorwachstum wurde daher nach der Formel:

$$D_{max} \times D_{min} \times \pi / 4 = A^* \qquad (1)$$

(D_{max} = größter Tumordurchmesser (cm),
D_{min} = kleinster Tumordurchmesser (cm), A^* = Ellipsenfläche (cm^2))

die jeweilige Tumorfläche berechnet (vgl. 3.3). Um die Datenverarbeitung durch einen Computer zu ermöglichen, werden alle Flächen A_n^* ($n \in N$) mit der Gleichung

$$A_n^* \times B = A_n, \quad (B = \frac{1}{(cm^2)}) \qquad (2)$$

normiert und die nun dimensionslosen Flächenwerte A_n mit dem Faktor 100 multipliziert. Die derart umgerechneten Zahlenwerte wurden semilogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Für jeden einzelnen Kontrolltumor wurde die zugehörige Regressionsgerade mit ihrem Korrelationskoeffizienten bestimmt. Bis zum makroskopisch sichtbaren Wachstum fanden sich bei den jeweiligen Tumoren, auch zwischen dem links- u. rechtsseitigen eines Tieres, verschieden lange Latenzzeiten. Jedoch waren die Steigungen der zugehörigen Wachstumskurven alle sehr ähnlich. Die variierenden Latenzen beruhten wahrscheinlich auf Unterschieden in den Anwachsverhältnissen im Wirtstier und in der transplantierten Zellzahl, die in den von uns implantierten Gewebestückchen nicht genau standardisierbar war. Deshalb definierten wir den Mittelwert der Tumorflächenwerte bei Therapiebeginn als "kritische Fläche" für das begonnene exponentielle Wachstum eines Transplantats, weil von uns nur sicher angewachsene Tumoren therapiert wurden. Diese "kritische Fläche" (KF) wurde für den B1 am 16. Tag und für den B13 am 11. Tag angesetzt, da zu diesen Zeitpunkten die meisten Kontrolltumoren eine sichtbare Volumenzunahme zeigten. Kleinere Werte blieben demzufolge als "nicht sicher angewachsen" für die Auswertung unberücksichtigt. Alle Kontrolltumoren wurden jetzt mit ihren gemessenen Flächenwerten auf der Zeitachse parallel so verschoben, daß ihre zugehörige Regressionsgerade durch die KF verläuft. Hierbei änderte sich die Steigung der Regressionsgeraden als Maß für das Wachstumsverhalten nicht. Es erhielten aber alle Kontrollen einen gemeinsamen und vergleichbaren Wachstumsbeginn. Die Zeitachse verlor ihren chronologischen Nullpunkt und zeigte nur noch Zeitintervalle an. Aus den so translatierten Flächenwerten der Kontrollen entstand eine Punktwolke. Es ließ sich daraus eine Regressionsgerade als Normkontrollkurve mit ihren statistischen

Parametern berechnen, die das allgemeine Wachstumsverhalten eines Tumors beschreibt (Abb. 6).

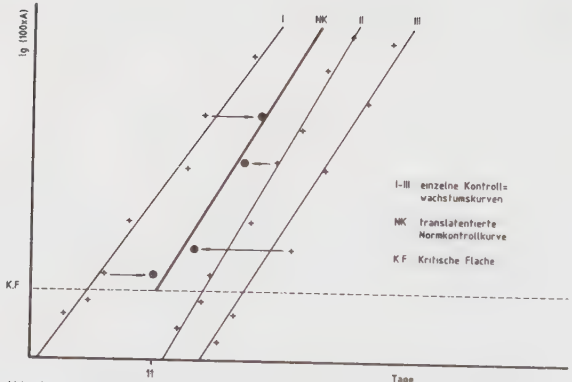


Abb. 6 Tumor B13: Schematische Darstellung der Translation einzelner Kontrollwachstumskurven zur Bildung der Normkontrollkurve

Wie bereits erwähnt hatten die Tumoren wegen unterschiedlicher Latenzzeiten auch zu Therapiebeginn nicht die gleiche Größe. Aber wegen des exponentiellen Tumorwachstums waren zumindest ähnliche Startbedingungen zum Kurvenvergleich Voraussetzung. Daher wurden die Flächenwerte der Tumoren zu Therapiebeginn auf der Zeitachse so verschoben, daß diese Werte zu demselben Zeitpunkt betrachtet wurden wie die gleichen Flächen der Normkontrollkurve. Nun hatten alle Therapiekurven einen dem Kontrollwachstum vergleichbaren Ausgangspunkt gewonnen, ohne in ihrer Steigung als Maß für ihr Wachstum verändert zu sein. Aus diesen derart entstandenen Punktwolken berechneten sich statistisch erfaßbare Normtherapiekurven, die das Wachstumsverhalten des Tumors unter der entsprechenden Zytostatikaapplikation beschreiben.

Wir erhielten somit für Kontroll- und Therapiekurven die Steigung, die Standardabweichung der Steigung ≙ dem 95 % - Konfidenzintervall, den y-Achsenabschnitt und den Korrelationskoeffizienten. Nach der allgemein geläufigen

Formel

$$VZ\ (Tage) = \frac{\ln 2}{b} \qquad (3)$$

(VZ = Tumorverdopplungszeit,
b = Steigung der Wachstumskurve)

wurde die jeweilige Tumorverdopplungszeit bestimmt. Nach der Formel

$$WV\ (\%) = \frac{VZ_{TH} - VZ_K}{VZ_K} \times 100 \qquad (4)$$

(K = Kontrolle, Th = Therapie, WV = Wachstumsverzögerung) berechneten wir die prozentuale Wachstumsverzögerung der Therapiekurven. Zur Signifikanzprüfung des unterschiedlichen Kurvenverlaufs, d.h. eines Therapieeffekts, führten wir einen F-Test durch. Dabei wird ein Steigungsvergleich auf Heterogenität unter Gewichtung der Standardabweichung vorgenommen (45). Signifikanz liegt vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 5,0$ ist, dabei wird $\alpha \leq 0,10$ als hochsignifikant, $\alpha \leq 1,0$ als signifikant und $\alpha \leq 5,0$ als schwachsignifikant bezeichnet. Wir testeten zuerst die Therapiekurven gegen die Kontrolle. Bei signifikantem Ergebnis eines Zytostatikums testeten wir dieses auch gegen die restlichen Zytostatika, um eine unterschiedliche oder gleichartige Wirksamkeit zu bestimmen (46).

3.6.2 Zellkinetik

Bei der histologischen Auswertung zählten wir die Mitosen getrennt nach Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen aus. Aus der Gesamtzahl der Mitosen pro 1000 Zellen bestimmten wir den Mitoseindex (MI). Das Mitosephasenverhältnis (PhV) berechneten wir aus dem Quotienten Pro- zu Meta-, Ana- und Telophasen. Zur Quantifizierung der Zellzahl pro Fläche eines Gesichtsfelds wurden an Kontrollpräparaten die für jeden Tumor spezifischen Durchschnittswerte ermittelt. Um eventuelle Veränderungen der Zellzahl nach Applikation der Zytostatika festzustellen, zählten wir stichprobenartig Präparate jeder Therapieform aus. Unter Therapie kam es jedoch nicht zu einer signifikanten Änderung der Zellzahl pro Fläche (Tab. 4a + b). Dadurch konnten wir eine definierte Fläche mit einer bestimmte Zellzahl gleichsetzen.

Die lichtmikroskopische Auswertung des im histologischen Schnittbild flächenhaft wachsenden Tumors B1 erfolgte bei einer Vergrößerung von 500 x mit Hilfe von Netzokularen als Maß für die Fläche. Da der Tumor B13 ein tubuloazinäres Wachstum zeigte, konnte die Fläche mit Netzokularen nicht berechnet werden. Daher verwendeten wir bei einer Endvergrößerung von 750 x mit Ölimmersion das halbautomatische Morphometriegerät Videoplan^{R} der Firma Kontron GmbH. Über einen Zeichentubus wurde ein Lichtzeiger von einer Magnetplatte in das auszuwertende Präparat eingeblendet. Unter mikroskopischer Kontrolle des Zeigers wurde die zu errechnende Fläche auf der Magnetplatte umfahren. Nach der Eichung des angeschlossenen Rechners mittels Objektmikrometer berechnete dieser automatisch aus den Veränderungen des Magnetfeldes die tatsächliche Fläche des Präparates. Es wurden repräsentative, vitale Bezirke jeden Präparates mit einer Gesamtfläche von mehr als 150 000μm^2 $\triangleq$ entsprechend ca. 1500 Zellen pro Präparat ausgewertet. Dies ist, wie vorab durchgeführte Kontrollzählungen ergaben, eine hinreichende Zellzahl, um die jeweils ermittelten Ergebnisse zu reproduzieren. Der MI und das PhV der ausgewerteten Tumoren wurden gegen die Zeit als Mittelwert mit 95 %-Konfidenzintervall und Einzelwerten graphisch dargestellt. Die Kontrollwerte sind zum Vergleich immer in die jeweilige Graphik miteingezeichnet. Die Ergebnisse der histologischen Auswertung wurden nun zweifach statistisch analysiert. Bei dem angewandten T-Test für gepaarte Stichproben wird ein Mittelwertsvergleich über den Zeitverlauf unter Einbeziehung der jeweiligen Mittelwertsdifferenzen und ihrer Streuung durchgeführt. Die Kontrolle wird dabei als zeitlich konstant angesehen (47). Im Rang-Test nach MANN-WHITNEY (sogenannter U-Test) werden den Einzelwerten der Stichproben Rangplätze nach zunehmender Größe zugeteilt und die Rangsummen miteinander verglichen (47). Die aus den Spalten "Mean Rank" ersichtliche Stichprobe mit der größeren Rangsumme hat auch durchschnittlich größere Stichprobenwerte. Ein signifikanter Unterschied liegt in beiden Tests vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 0{,}05$ ist; dabei ist $\alpha \leq 0{,}001$ hochsignifikant, $\alpha \leq 0{,}010$ signifikant und $\alpha \leq 0{,}050$ schwach signifikant. Ähnlich wie bei den Wachstumskurven wurden die Zellkinetikkurven zuerst gegen die Kontrolle und dann untereinander getestet, um Wirkungsunterschiede der Zytostatika nachzuweisen. Alle statistischen und mathematischen Operationen wurden an der Großrechenanlage des Medizinischen Instituts für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf durchgeführt. Die statistischen Tabellen sind jeweils am Ende des entsprechenden Abschnitts aufgeführt. Die Wachstums- und Zellkinetikkurven sind alle im Kapitel 6 (S. 46ff.) zusammengefaßt.

Zytostatikum	Anzahl (Mäuse)	Σ Fläche (mm^2)	Σ Zellzahl	Zellen / mm^2	Standard-abweichung
Kontrolle	5	0,5371	5478	10199	± 452,4
Adriblastin	3	0,3164	3109	9826	± 40,3
Endoxan	3	0,3575	3528	9869	± 103,2
Lomustin	3	0,3443	3288	9550	± 500,2
Methotrexat	3	0,3191	3260	10217	± 185,3
Vincristin	3	0,3763	3650	9700	± 181,4

Tab. 4a , Tumor B13 : Ermittlung der Zellzahl/Fläche und der Standardabweichung

Zytostatikum	Anzahl (Mäuse)	Σ Fläche (mm^2)	Σ Zellzahl	Zellen / mm^2	Standard-abweichung
Kontrolle	3	0,5290	5107	9654	± 139,8
Adriblastin	3	0,4761	4490	9431	± 56,2
Endoxan	3	0,4761	4627	9719	± 37,3
Lomustin	3	0,4761	4594	9649	± 24,3
Methotrexat	3	0,4761	4592	9645	± 38,1
Vincristin	3	0,4761	4594	9649	± 64,4

Tab. 4b , Tumor B1 : Ermittlung der Zellzahl/Fläche und der Standardabweichung

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Tumor B13

4.1.1 Wachstum

Der fast parallele Kurvenverlauf der einzelnen Kontrollkurven wird in Tabelle 1a durch die zugehörigen statistischen Parameter dargestellt. Ähnliche Steigungsmaße und Tumorverdoppelungszeiten verdeutlichen die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit. Die unterschiedlichen y-Achsenabschnitte beweisen die verschiedenen Latenzzeiten bis zum kontinuierlichen Tumorwachstum. Wie unter 3.6.1 beschrieben, wird die "kritische Fläche" am 11. Tag nach Transplantation mit 0,37 cm^2 berechnet. Nach Translation der Einzelkontrollkurven erhalten wir die in Abb. 7 dargestellte Punktwolke. Daraus läßt sich die eingezeichnete Normkontrollkurve des Tumors B13 herleiten. Die zugehörigen statistischen Angaben stehen in Tab. 2. Auf den Abb. 8-12 sind die nach Translation entstandenen Wachstumskurven der zytostatisch behandelten Tumoren eingezeichnet. Die statistischen Parameter sind ebenfalls in Tab. 2 aufgeführt. Alle Kurven zeigen eine sehr hohe Korrelation bei kleiner Standardabweichung. Zur Verdeutlichung des von der Kontrolle unterschiedlichen Verlaufs wurden die translatierten Wachstumskurven in Abb. 13 mit einem gemeinsamen Nullpunkt dargestellt. Ihr aus Tab. 2 ersichtlicher, gering differierender y-Achsenabschnitt kommt dadurch zustande, daß die Therapiekurven vom Therapiebeginn und damit von einem verlangsamten Wachstumsverhalten aus auf den Nullpunkt extrapoliert werden. Abb. 13 veranschaulicht, daß alle Therapiekurven zwar flacher als die Kontrollkurve verlaufen, aber nur unter Endoxantherapie ist in der semilogarithmischen Darstellung eine deutliche Wachstumsverzögerung erkennbar. Daraus berechnet sich eine verlängerte Tumorverdoppelungszeit und eine Wachstumsverzögerung von ca. 20 % (s. Tab. 3). Alle anderen Zytostatika zeigen schon graphisch durch den Verlauf ihrer Wachstumskurven nur eine ganz geringe Wirksamkeit (Abb. 13). Dies wird mit der statistischen Auswertung bestätigt. Das Ergebnis des F-Tests gegen die Kontrolle (Tab. 3) weist ausschließlich für END eine schwache Signifikanz auf. Wird END gegen die anderen Zytostatika getestet, so erhält man analog zur Graphik fast einen signifikanten Unterschied zu ADR und MTX, aber keine Signifikanz zu CCNU und VCR. Mit der vorliegenden ausführlichen Auswertung des Wachstumsverhaltens des Tumors B13 unter der beschriebenen Zytostatikatherapie läßt sich eine geringe Chemosensibilität für END nachweisen. Doch ist diese für klinische Aspekte viel zu gering, um einen Therapieversuch mit Erfolgsaussicht zu rechtfertigen.

Maus-Nr.	Steigung	Y-Achsen-abschnitt	Korrelation	Tumorverdopplungszeit (Tage) $\frac{\ln 2}{b}$
01	0,0226	-0,43595	0,94	13,32
02	0,0318	-0,85195	0,91	9,47
03	0,0308	-0,65918	0,98	9,78
04	0,0244	-0,63896	1,00	12,33
05	0,0261	-0,52180	0,98	11,53
06	0,0285	-0,77477	0,89	10,56
07	0,0320	-0,80800	0,99	9,41
08	0,0229	-0,65006	0,99	13,15
09	0,0233	-0,83718	0,98	12,92
10	0,0266	-0,75573	0,99	11,32
11	0,0251	-0,92490	0,99	12,00

Tab. 1a, Tumor B13 : Regressionsgeraden, Korrelationen und Tumorverdopplungszeiten der einzelnen Kontrolltiere

Zytostatikum	Steigung	Standard-abweichung	Y-Achsen-abschnitt	Korrelation
Kontrolle	0,02459	0,00137	1,30166	0,88
Adriblastin 1,0mg/kg i.p.	0,02296	0,00073	1,35802	0,97
Endoxan 95 mg/kg i.p.	0,02056	0,00099	1,44565	0,93
Lomustin 75 mg/kg p.o.	0,02218	0,00071	1,31705	0,93
Methotrexat 1,4mg/kg i.p.	0,02357	0,00119	1,34399	0,94
Vincristin 0,2mg/kg i.p.	0,02205	0,00089	1,36024	0,95

Tab. 2, Tumor B13 : Regressionsgeraden, Standardabweichungen und Korrelationen der translatierten Wachstumskurven

Zytostatikum	Tumorverdopplungszeit VZ $\frac{\ln 2}{b}$ (Tage)	rel. Wachstumsverzögerung $\frac{VZ_{zyt} - VZ_{kon}}{VZ_{kon}}$ %	F-Test gegen Kontrolle Prüfgröße	Irrtumswahrscheinlichkeit		F-Test gegen Endoxan Prüfgröße	Irrtumswahrscheinlichkeit
Kontrolle	12,24	0,0	--	--		--	--
Adriblastin	13,11	7,11	1,107	29,263		3,792	5,150
Endoxan	14,64	19,61	5,681	1,714	x	--	--
Lomustin	13,57	10,87	2,450	11,765		1,755	18,527
Methotrexat	12,77	4,33	0,317	57,316		3,772	5,211
Vincristin	13,65	11,52	2,427	11,928		1,243	26,499

xxx = hochsignifikant, xx = signifikant, x = schwach signifikant

Tab.3, Tumor B13 : Tumorverdopplungszeit, rel. Wachstumsverzögerung und Ergebnisse der Teststatistik der translatierten Wachstumskurven

4.1.2 Zellkinetik

Auf der Abb. 4 sieht man eine Übersichtsvergrößerung des Tumors nach Therapie mit END. In der sichtlich veränderten Histomorphologie fallen die nekrotischen Bezirke auf, die mit den schlingenförmig angeordneten Zelltrümmern noch an die ursprüngliche tubulo-azinäre Gewebestruktur erinnern. Interessant ist dabei die Beobachtung, daß Nekrosezonen übergangslos neben morphologisch völlig intakten und vitalen Gewebebezirken bestehen. In der Tab. 4 sind die zur Ermittlung der Zellzahl/Fläche durchgeführten Zellzählungen aufgeführt. Danach liegen auf 1 mm^2 Gewebe des Tumors B13 etwa 10.200 Zellen. Die durchschnittliche Fläche einer einzelnen Zelle beträgt demnach 98 μm^2.

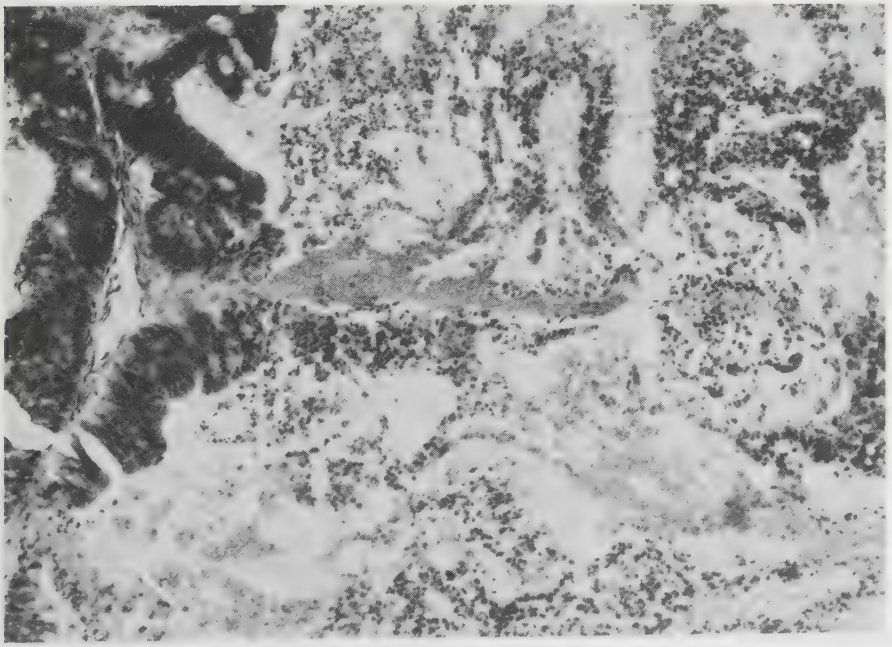


Abb. 4: Adenokarzinom/Lunge B13 nach Therapie mit Endoxan, Vergrößerung ca. 430 x

In Tab. 5 sind die pro Meßzeitpunkt ausgewertete Anzahl Präparate, die ausgewertete Gesamtfläche und die proportionale Zellzahl, der MI und das PhV aufgeführt. Mitoseindex und -phasenverhältnis sind in Abb. 14-23 gegen die Zeit graphisch aufgetragen. Unter Behandlung mit CCNU fallen innerhalb von 24 Stunden der MI um 50 % und das PhV um ca. 35 % ab. Der MI steigt nach 14 Tagen wieder gering an, bleibt aber unterhalb der Kontrollwerte. Nach Endoxanapplikation fallen MI und PhV ebenfalls deutlich ab, sie liegen jedoch nur knapp außerhalb des Streuungsbereichs der Kontrolle. Bei der Therapie mit MTX werden teilweise sehr unterschiedliche Meßwerte innerhalb eines Meßzeitpunkts bestimmt. Ein eindeutiger Effekt ist am MI und PhV nicht nachweisbar. VCR verursacht zuerst einen Abfall des MI, der aber nach 3 Tagen wieder auf Ausgangswerte ansteigt. Das PhV verläuft mit geringen Schwankungen im Kontrollbereich. Unter Adriblastintherapie sind die Meßwerte an den einzelnen Meßzeitpunkten nur tendenziell ähnlich und weisen die größten Schwankungen auf. Es werden sogar hoch- bis übernormale Einzelwerte gefunden. Die Mittelwerte von MI und PhV verlaufen im Normbereich. Zum direkten Vergleich sind alle Mittelwertskurven in den Abb. 24 u. 25 noch einmal ohne die entsprechenden Konfidenzintervalle dargestellt. Die Ergebnisse der statistischen Tests bestätigen die aus den Zeichnungen zu interpretierenden Aussagen (Tab. 6 u. 7). Die Lomustintherapie verursacht einen hochsignifikanten Abfall beider Parameter. Das bedeutet, daß die Anzahl der Mitosen absolut und der Anteil der Prophasen relativ zurückgegangen ist. Den gleichen Effekt mit schwächer ausgeprägter Signifikanz zeigt die Therapie mit END. Der absolute Rückgang der Mitosen muß ursächlich auf eine Chemosensibilität und damit Wachstumshemmung des Tumorgewebes zurückgeführt werden. Die Verkleinerung des Quotienten Prophasen zu Meta-, Ana- u. Telophasen ist schwieriger zu deuten. Die theoretische Möglichkeit, daß die Prophase unter Zytostatikatherapie schneller als bei unbehandeltem Gewebe abläuft, ist höchst unwahrscheinlich(61). Vermutlich kommt es durch die Therapie zu Störungen der Metaphase. Offensichtlich benötigen die verbliebenen teilungsfähigen Zellen mehr Zeit, um diese Zellteilungsphase zu durchlaufen. Da sich also relativ mehr Zellen bei der Teilung in der Metaphase befinden als unter Kontrollbedingungen zu erwarten wäre, könnte man sich diesen Effekt für eine gezielte Kombinationstherapie mit einem metaphasenspezifischen Zytostatikum (z.B. Vinkaalkaloide) zunutze machen. Die unterschiedlichen Signifikanzniveaus bei END im T- und U-Test erklären sich mit der jeweiligen Testtheorie. Im T-Test wird ein Mittelwertsvergleich vorgenommen, bei dem "Ausreißer" nicht so stark gewichtet werden wie im U-Test.

In letzterem erhalten sie entsprechend hohe Rangpläte und beeinflussen die Rangsummen merklich. Methotrexat und Vincristin sind statistisch ohne signifikanten Effekt. Auf die bei diesem Tumor eher mitosefördernde Wirkung von Adriblastin weisen die negativen Prüfgrößen im T-Test und die im Vergleich zur Kontrolle größeren Rangsummen im U-Test hin. Die guten Ergebnisse der Lomustintherapie werden auch im direkten statistischen und graphischen Vergleich der Zytostatika untereinander deutlich (Abb. 24). Der MI nach Lomustinapplikation ist im T- und U-Test jeweils signifikant bis hochsignifikant unterschiedlich zu denen der anderen Zytostatika (Tab. 6 u.7).
Nach den Ergebnissen der zellkinetischen Untersuchungen bietet sich CCNU am ehesten für eine gezielte Chemotherapie dieses Tumors an. Bei der Analyse des Wachstumsverhaltens mußte man diesen Tumor als fast resistent für die verwendeten Zytostatika betrachten. Durch die Ergebnisse der zellkinetischen Auswertung wird jedoch eine Chemosensibilität für CCNU und END aufgezeigt. Die alleinige Beobachtung des Tumorwachstums erweist sich damit als ein zu unscharfes Maß zur Abschätzung eines Therapieeffekts.

Zytostatikum	Meßpunkt (Tage)	Anzahl (Mäuse)	Σ Fläche (mm^2)	Σ Zellzahl	Mitose-Index	Phasenverhältnis
Kontrolle	--	5	1,9197	19580,9	38,8523	1,0424
Adriblastin	0,33	2	0,4465	4554,3	45,4863	1,3343
	1	3	0,6583	6714,7	40,0838	1,0881
	3	3	0,5048	5149,0	43,3234	1,2556
	7	3	0,8497	8666,9	42,6248	0,9505
	14	3	0,4985	5084,7	41,4803	0,6905
	21	3	0,4760	4855,2	29,7212	1,4066
Endoxan	0,33	2	0,2574	2625,5	21,7570	0,9167
	1	3	0,4828	4924,6	28,4192	0,6526
	3	3	0,4944	5042,9	35,6456	0,7324
	7	4	0,6301	6427,0	31,4513	0,7449
	14	6	1,4037	14317,7	27,7070	0,7059
	21	5	0,8834	9010,7	28,5103	0,6867
Lomustin	0,33	3	0,5465	5574,3	21,0159	0,7587
	1	3	0,5420	5528,4	14,4866	0,6209
	3	3	0,5156	5259,1	13,9278	0,4679
	7	6	1,1251	11476,0	18,0469	0,6404
	14	5	0,9313	9499,3	16,2887	0,6406
	21	7	1,5151	15454,0	24,4087	0,6002

Tab. 5, Tumor B13 : Ergebnisse der zellkinetischen Auswertung

Zytostatikum	Meßpunkt (Tage)	Anzahl (Mäuse)	Σ Fläche (mm^2)	Σ Zellzahl	Mitose-Index	Phasenverhältnis
Methotrexat	0,33	2	0,3122	3184,4	26,1857	0,7029
	1	3	0,5392	5499,8	28,8758	0,9162
	3	3	0,5184	5287,7	36,8307	0,9595
	7	3	0,5357	5482,5	31,5886	1,0357
	14	4	0,8884	9061,7	34,1681	0,8430
	21	3	0,5211	5315,2	31,8818	0,9896
Vincristin	0,33	2	0,3465	3534,3	43,5572	0,5406
	1	3	0,4870	4967,4	29,7464	0,6171
	3	3	0,4781	4876,6	41,3735	1,0554
	7	3	0,7859	8016,2	42,5974	0,5215
	14	4	0,7340	7486,8	38,3326	0,9340
	21	4	0,7182	7325,6	37,7198	0,8231

Tab. 5, Tumor B13 : Ergebnisse der zellkinetischen Auswertung (Fortsetzung)

Zytostatikum	T-Test für gepaarte Stichproben gegen Kontrolle getestet: Mitose-Index Prüfgröße	Irrtumswahrsch.	Phasenverhältnis Prüfgröße	Irrtumswahrsch.
Adriblastin	-0,27	0,788	-0,78	0,445
Endoxan	4,05	0,000 xxx	3,13	0,004 xx
Lomustin	8,42	0,000 xxx	4,87	0,000 xxx
Methotrexat	2,21	0,039 x	0,98	0,337
Vincristin	0,24	0,810	1,58	0,129
	gegen Lomustin getestet:			
Adriblastin	-6,40	0,001 xx	-4,21	0,008 xx
Endoxan	-3,55	0,016 x	-3,50	0,017 x
Methotrexat	-5,08	0,004 xx	-3,61	0,150
Vincristin	-0,93	0,000 xxx	-1,04	0,345

xxx = hochsignifikant, xx = signifikant, x = schwach signifikant

Tab. 6, Tumor B13 : Ergebnisse des T-Tests für gepaarte Stichproben für Mitose-Index und Mitose-Phasenverhältnis

Zytostatikum	MANN - WHITNEY - Rang Test (U - Test)					
	gegen Kontrolle getestet :					
	Mitose-Index			Phasenverhältnis		
	Mean Rank Zytostat.	Mean Rank	Irrtums-wahrsch.	Mean Rank Zytostat.	Mean Rank	Irrtums-wahrsch.
Adriblastin	12,84	11,20	0,644	13,00	10,60	0,499
Endoxan	12,70	22,80	0,010 x	12,74	22,60	0,013 x
Lomustin	14,00	30,00	0,000 xxx	14,17	29,10	0,001 xxx
Methotrexat	10,61	17,00	0,067	11,72	13,00	0,709
Vincristin	12,42	12,80	0,915	11,03	18,10	0,044 x
	gegen Lomustin getestet :					
Adriblastin	36,74	14,19	0,000 xxx	34,11	16,04	0,000 xxx
Endoxan	37,78	15,04	0,000 xxx	30,11	21,57	0,039 x
Methotrexat	35,39	14,74	0,000 xxx	33,78	15,81	0,000 xxx
Vincristin	37,00	14,00	0,000 xxx	28,45	20,02	0,036 x

xxx = hochsignifikant, xx = signifikant, x = schwach signifikant

Tab. 7, Tumor B13 : Ergebnisse des U - Tests für Mitose-Index und Mitose-Phasenverhältnis

4.2 Tumor B1

4.2.1 Wachstum

Aus den Regressionsanalysen der einzelnen Kontrollkurven wird das vergleichbar schnelle Tumorwachstum bei unterschiedlichen Latenzzeiten ersichtlich (Tab. 1b). Mit einer KF von 0,6 cm^2 am 16. Tag nach Transplantation wird die Normkontrollkurve berechnet (Tab. 8) und auf Abb. 26 graphisch dargestellt. Die Wachstumskurven unter Zytostatikatherapie sind auf den Abb. 27-31 eingezeichnet, die zugehörigen statistischen Parameter in Tab. 8 aufgeführt. Alle Kurven sind bei niedriger Standardabweichung hoch korreliert. Bereits die Interpretation der in Abb. 32 zusammengefaßten Kurvenverläufe zeigt eine deutliche Wachstumsverzögerung für alle Zytostatikaapplikationen. Die längste Tumorverdopplungszeit mit einer Wachstumsverzögerung von 33 % tritt unter Methotrexattherapie auf. Dies wird auch im F-Test gegen die Kontrolle bestätigt (Tab. 9). Bei MTX ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied zur Kontrolle, alle anderen Zytostatika führen zu signifikanten Ergebnissen. Wir testeten nun den Wachstumsverlauf unter Methotrexatapplikation gegen den der anderen Zytostatikatherapien (Tab. 9). Dabei läßt sich jedoch statistisch für MTX keine bessere Wirksamkeit sichern. Aus der Analyse des Wachstumsverhaltens des kleinzelligen Bronchialkarzinoms B1 ist somit eine Chemosensibilität für alle verwendeten Zytostatika nachgewiesen.

Maus-Nr.	Steigung	Y-Achsen-abschnitt	Korrelation	Tumorverdopplungszeit $\frac{\ln 2}{b}$ (Tage)
01	0,03716	-1,32291	0,99	8,10
02	0,02977	-0,76237	0,98	10,11
03	0,03322	-1,19002	0,95	9,06
04	0,03264	-0,63063	0,91	9,22
05	0,03954	-1,56927	0,89	7,61
06	0,03006	-1,15771	0,98	10,01
07	0,03204	-0,78972	0,99	9,40
08	0,03950	-1,09761	0,99	7,62
09	0,03190	-0,94425	0,98	9,45

Tab. 1b, Tumor Bl : Regressionsgeraden, Korrelationen und Tumorverdopplungszeiten der einzelnen Kontrolltiere

Zytostatikum	Steigung	Standard-abweichung	Y-Achsen-abschnitt	Korrelation
Kontrolle	0,03247	0,00138	1,21450	0,91
Adriblastin 1,0mg/kg i.p.	0,02680	0,00135	1,28626	0,97
Endoxan 95 mg/kg i.p.	0,02610	0,00171	1,27061	0,91
Lomustin 75 mg/kg p.o.	0,02531	0,00212	1,13350	0,86
Methotrexat 1,4mg/kg i.p.	0,02436	0,00127	1,29939	0,92
Vincristin 0,2mg/kg i.p.	0,02633	0,00110	1,33423	0,95

Tab. 8, Tumor Bl : Regressionsgeraden, Standardabweichungen und Korrelationen der translatierten Wachstumskurven

Zytostatikum	Tumorverdopplungszeit VZ $\frac{\ln 2}{b}$ (Tage)	rel. Wachstumsverzögerung $\frac{VZ_{zyt} - VZ_{kon}}{VZ_{kon}}$ %	F-Test gegen Kontrolle Prüfgröße	Irrtumswahrscheinlichkeit		F-Test gegen Methotrexat Prüfgröße	Irrtumswahrscheinlichkeit
Kontrolle	9,27	0,0	--	--		--	--
Adriblastin	11,23	21,14	7,016	0,808	xx	--	--+)
Endoxan	11,53	24,38	6,967	0,830	xx	0,663	41,550
Lomustin	11,89	28,26	6,755	0,935	xx	0,147	70,127
Methotrexat	12,36	33,33	16,423	0,005	xxx	--	--
Vincristin	11,43	23,30	10,118	0,147	xx	1,364	24,280

+) wegen unterschiedlicher Stichprobenumfänge nicht vergleichbar

xxx = hochsignifikant, xx = signifikant, x = schwach signifikant

Tab. 9, Tumor B1 : Tumorverdopplungszeit, rel. Wachstumsverzögerung und Ergebnisse der Teststatistik der translatierten Wachstumskurven

4.2.2 Zellkinetik

Die Abb. 5 zeigt exemplarisch die nach der Therapie mit jedem Zytostatikum aufgetretenen histologischen Veränderungen. In den inselförmigen Gewebsnekrosen finden sich die typischen Zeichen des Zelluntergangs wie Kernpyknose, Karyorhexis und Zytolyse. Die Ergebnisse der zur Ermittlung des Verhälnisses Zellzahl/Fläche ausgezählten Präparate stehen in Tab. 4. Auf 1 mm^2 Tumorfläche des B1 liegen durchschnittlich 9600 Zellen, dies entspricht einer Einzelzellfläche von 104 μm^2. In Tab. 10 sind die Ergebnisse der zellkinetischen Untersuchungen analog denen des B13 aufgeführt. Die Veränderungen von MI und PhV während der Versuchszeit sind als Mittelwert mit Konfidenzintervall für die entsprechenden Zytostatika in den Abb. 33-42 eingezeichnet. Aus der gemeinsamen Darstellung der Kurven in den Abb. 43 und 44 ist ersichtlich, daß es unter der Therapie mit allen verwendeten

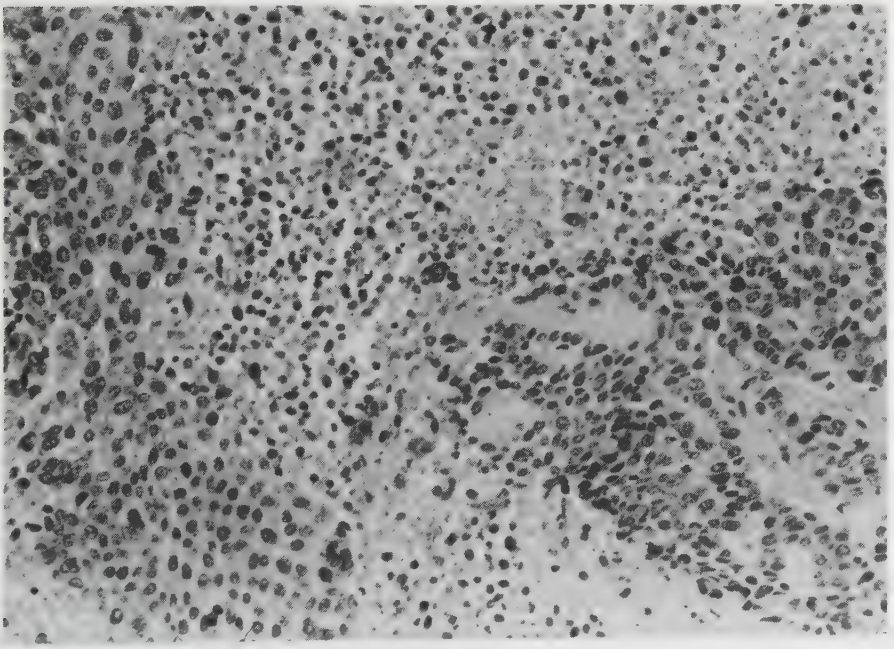


Abb. 5: kleinzelliges Bronchialkarzinom B1 nach Therapie mit Lomustin, Vergrößerung ca. 870 x

Zytostatika zu Versuchbeginn zu einem Abfall des MI kommt. Nach Lomustingabe ist dieser Effekt mit einer Reduktion von 66 % am ausgeprägtesten. Durch Vincristin- und Adriblastinapplikation tritt ein relativ gleichförmiger Abfall von MI und PhV auf, wobei dieser bei VCR größer als bei ADR ist. Unter Lomustintherapie steigen die Werte von MI und PhV parallel am 14. Tag nach Zytostatikainstillation auf Normal- bis Subnormalwerte an, um anschließend wieder steil abzufallen. Unter Endoxangabe tritt bei konstant erniedrigtem MI ebenfalls nach 14 Tagen ein Peak im PhV auf.
Ein gegensätzlicher Verlauf findet sich nach Methotrexatinjektion. Während der Versuchsdauer bleibt das PhV gleichförmig erniedrigt, nach 24 Stunden erfolgt aber ein geringer und nach 14 Tagen ein deutlicher Anstieg der MI bis auf Normalwerte. In beiden statistischen Tests werden hochsignifikante Unterschiede fast aller Mitoseindices zu den Kontrollwerten nachgewiesen (Tab. 11 u. 12). Nur im U-Test wird für MTX eine schwache Signifikanz des MI errechnet, da der Kurvenpeak am 14. Versuchstag hierbei durch die zugrundeliegende Testtheorie stärker als im T-Test berücksichtigt wird.
Das PhV ist für alle Zytostatika zur Kontrolle signifikant verschieden. Dabei besteht für die Lomustin- und Endoxantherapie im U-Test wegen des ungleichmäßigen Meßwertverlaufs ein schwächeres Signifikanzniveau als im T-Test. Die Methotrexattherapie weist in beiden Tests wegen des konstant verringerten PhV bei nur geringen Meßwertschwankungen ein hochsignifikantes Ergebnis auf. Aus den vorliegenden Tests ist noch keine unterschiedliche Wirksamkeit der einzelnen Zytostatika ablesbar. Daher testen wir die Ergebnisse der Lomustintherapie gegen die der anderen Zytostatika (Abb. 11), ohne im T-Test - von einer schwachen Signifikanz gegenüber Adriblastin abgesehen - eine eindeutige Aussage zu erhalten. Erst im U-Test wird erkennbar, daß der MI nach Lomustinapplikation signifikant stärker als bei den übrigen Substanzen abfällt. Die PhV'e sind in beiden Tests ohne signifikante Abweichung. Diskutiert werden müssen die Ursachen des ungleichmäßigen Verlaufs von MI und PhV bei verschiedenen Zytostatika. Die Zunahme von MI und PhV am 14. Tag unter Lomustintherapie ist auf eine absolute und relative Zunahme des Prophasenanteils zurückzuführen. Unter Methotrexatapplikation werden am 14. Tag ebenfalls vermehrt Mitosen, jedoch ohne Verschiebung des Phasenverhältnisses, beobachtet. Nach Endoxaninjektion tritt am 14. Tag p.i. eine ausschließlich relative Zunahme des Prophasenanteils ohne Änderung der Gesamtzahl der Mitosen auf. Zur Erklärung dieser Effekte lassen sich mehrere Mechanismen ausführen. Der relative Prophasenanstieg unter Endoxanapplikation kann durch den bifunktionellen Angriffspunkt des Alkylans in der S-

und G_2-Phase als Teilsynchronisation gedeutet werden. Dieser Erklärungsversuch wird unterstützt durch die Annahme eine prämitotischen Blocks, der für Endoxan beschrieben wird (54). Die multiple Zytostatikawirkung könnte die Ursache für eine verlängerte Prophase sein. Weil die Lomustinapplikation aber schon 14 Tage vor dem Mitosenanstieg erfolgte, ist die theoretische Möglichkeit einer Teilsynchronisation hier ziemlich unwahrscheinlich. Zudem sind für Lomustin keine phasenspezifischen Angriffspunkte bekannt. Methotrexat als Folsäureantagonist wirkt vornehmlich in der S-Phase und interferiert mit der DNA-Synthese. Daher bleibt auch das Phasenverhältnis unbeeinflußt. Zur Deutung der Kurvenpeaks unter Lomustin- und Methotrexatapplikation muß man verschiedene homöostatische Mechanismen der Tumorgewebe betrachten:

1. Rekruitment: es gibt ein Rekruitment in der Go-Phase ruhender Zellen, die bei Tumorschädigung - gerade nach Zytostatikaeinwirkung - sich zu teilen beginnen und eine weitere Gewebeproliferation bewirken (94, 98). Für den Tumor B1 ist in zellkinetischen Untersuchungen diese sogenannte "Resting Phase" mit einem Anteil von ca. 50 % bestimmt worden;
2. Zelluläre Heterogenität: für fast alle Neoplasmen ist gesichert, daß auch ein histologisch als homogen klassifizierter Tumor, wie z.B. dieses kleinzellige Bronchialkarzinom (Vgl. Abb. 2), aus heterogenen Zellinien besteht, die unterschiedlich auf eine zytostatische Therapie ansprechen (39, 58, 65) (vgl. 3.2.2). Es wird beschrieben, daß kleine zytostatikaresistente Zellsubpopulationen nach Zerstörung der bisher dominierenden, sensiblen Zellklone überwuchern (36);
3. DNA-Repair: Chemoresistenz wird auch durch Repairmechanismen der Tumorzelle erreicht, die mit Hilfe spezieller Reparaturenzyme zytostatisch bedingte DNA-Schäden korrigieren und Fehler im Metabolismus kompensieren (22);
4. Metabolisierung: der reversibel kompetitiv hemmende Antimetabolit Methotrexat kann von den betroffenen Zellen verbraucht oder durch alternative Stoffwechselwege umgangen werden (60).

Die Existenz der genannten Mechanismen ist experimentell gesichert. Aber im Einzelfall läßt sich kaum oder nur mit großem Aufwand nachweisen, welcher für den gefundenen Effekt ursächlich verantwortlich ist. Zudem werden trotz umfangreicher Deutungsversuche homöostatische Mechanismen und ihre Interaktionen noch unzureichend verstanden.

Alle angewendeten Zytostatika bewirken eine therapeutisch erwünschte Veränderung des Wachstumsverhaltens und der Mitoserate. Durch die signifikant

reduzierte Wachstumgsgeschwindigkeit und die veränderte Zellkinetik empfiehlt sich Lomustin für die klinische Therapie des Tumors B1. In einem Kombinationsversuch könnte versucht werden, sich den Anstieg von MI und PhV am 14. Tag nach Lomustinapplikation therapeutisch nutzbar zu machen. Das ebenfalls wirksame, metaphasenspezifische Vincristin würde dazu eine auf experimentelle Ergebnisse gestützte Ergänzung der Therapie darstellen (89).

Zytostatikum	Meßpunkt (Tage)	Anzahl (Mäuse)	Σ Fläche (mm^2)	Σ Zellzahl	Mitose-Index	Phasenverhältnis
Kontrolle	--	3	1,0051	9709,3	32,7826	0,4343
Adriblastin	0,33	3	0,4761	4599,2	20,2174	0.0809
	1	3	0,4761	4599,2	16,3043	0,1865
	4	3	0,4761	4599?2	13,6957	0,1939
	7	3	0,7406	7154,2	20,2019	0,2168
	14	3	0,5290	5110,1	24,0217	0,2887
	21	3	0,4761	4599,2	24,7826	0,2914
Endoxan	0,33	3	0,4761	4599,2	16,5217	0,0660
	1	3	0,4761	4599,2	19,7826	0,0995
	4	3	0,4761	4599,2	12,6087	0,1013
	7	3	0,5290	5110,1	18,0435	0,1361
	14	3	0,5290	5110,1	22,0109	0,4601
	21	4	0,6348	6132,2	18,5870	0,0762
Lomustin	0,33	4	0,6348	6132,2	15,9783	0,0560
	1	3	0,4761	4599,2	10,0000	0,0708
	4	4	0,6348	6132,2	8,6431	0,1506
	7	3	0,4761	4599,2	11,5217	0,2458
	14	3	0,5290	5110,1	27,0652	0,3978
	21	3	0,5290	5110,1	12,9348	0,0707

Tab. 10, Tumor B1 : Ergebnisse der zellkinetischen Auswertung

Zytostatikum	Meßpunkt (Tage)	Anzahl (Mäuse)	Σ Fläche (mm^2)	Σ Zellzahl	Mitose-Index	Phasenverhältnis
Methotrexat	0,33	3	0,4761	4599,2	15,8696	0,1281
	1	3	0,4761	4599,2	24,1304	0,1302
	4	3	0,4761	4599,2	12,8261	0,0949
	7	3	0,5290	5110,1	12,8804	0,2639
	14	3	0,6877	6643,2	31,5326	0,2202
	21	4	0,6877	6643,2	16,3043	0,1716
Vincristin	0,33	3	0,4761	4599,2	21,3043	0,0890
	1	3	0,4761	4599,2	26,3043	0,1292
	4	2	0,3174	3066,1	16,3043	0,0870
	7	3	0,5290	5110,1	17,0652	0,2134
	14	3	0,5819	5621,2	20,1630	0,3164
	21	5	0,7935	7665,2	13,6957	0,2357

Tab. 10, Tumor B1 : Ergebnisse der zellkinetischen Auswertung (Fortsetzung)

Zytostatikum	T-Test füt gepaarte Stichproben			
	gegen Kontrolle getestet :			
	Mitose-Index		Phasenverhältnis	
	Prüf-größe	Irrtums-wahrsch.	Prüf-größe	Irrtums-wahrsch.
Adriblastin	3,87	0,001 xxx	2,97	0,008 xx
Endoxan	6,59	0,000 xxx	3,15	0,005 xx
Lomustin	4,74	0,000 xxx	3,48	0,002 xxx
Methotrexat	3,21	0,004 xxx	5,39	0,000 xxx
Vincristin	4,68	0,000 xxx	2,93	0,008 xx
	gegen Lomustin getestet :			
Adriblastin	-2,69	0,043 x	-0,95	0,385
Endoxan	-1,68	0,154	0,35	0,741
Methotrexat	-2,24	0,076	0,07	0,949
Vincristin	-1,53	0,188	-0,35	0,741

xxx = hochsignifikant, xx = signifikant, x = schwach signifikant

Tab. 11, Tumor Bl : Ergebnisse des T-Tests für gepaarte Stichproben für Mitose-Index und Mitose-Phasenverhältnis

Zytostatikum	MANN - WHITNEY - Rang Test (U - Test)					
	gegen Kontrolle getestet :					
	Mitose-Index			Phasenverhältnis		
	Mean Rank Zytostat.	Mean Rank	Irrtums-wahrsch.	Mean Rank Zytostat.	Mean Rank	Irrtums-wahrsch.
Adriblastin	9,50	20,00	0,002 xxx	9,67	19,00	0,011 x
Endoxan	10,00	21,00	0,001 xxx	10,21	19,67	0,014 x
Lomustin	10,52	21,83	0,001 xxx	10,65	21,00	0,008 xx
Methotrexat	10,21	19,67	0,014 x	10,00	21,00	0,001 xxx
Vincristin	10,00	21,00	0,001 xxx	10,26	19,33	0,021 x
	gegen Lomustin getestet :					
Adriblastin	24,69	14,83	0,006 xx	22,08	17,17	0,174
Endoxan	25,08	15,17	0,007 xx	19,53	20,45	0,800
Methotrexat	24,58	15,56	0,014 x	22,16	17,95	0,249
Vincristin	25,11	15,15	0,006 xx	22,13	17,97	0,255

xxx = hochsignifikant, xx = signifikant, x = schwach signifikant

Tab. 12, Tumor B1 : Ergebnisse des U - Tests für Mitose-Index und Mitose-Phasenverhältnis

4.3 Auswertungsmodell

Die Messung der Tumorgröße stellt ein schnelles und einfaches Verfahren dar, um therapiebedingte Alterationen in der Wachstumsgeschwindigkeit abzuschätzen. In der Literatur wird dieses Verfahren zur Auswertung von Therapiestudien fast ausschließlich angewendet. Dabei wird allein aus der graphischen Darstellung des Tumorswachstums der Therapieeffekt abgeschätzt. Von uns ist nun ein Verfahren zur Wachstumsanalyse erarbeitet worden, um die aufwendigen Tierversuche genauer auszuwerten. Vorteil des vorgelegten statistischen Modells ist es, durch mathematisch zulässige und biologisch sinnvolle Operationen das Wachstumsverhalten transplantierter Tumoren von dem einzelnen Versuchstier zu verallgemeinern. Durch Translationen und genau definierte Meßparameter werden gleiche Start- und Testbedingungen geschaffen. Dadurch erhält man eine Funktion, die das durchschnittliche Wachstumsverhalten des jeweiligen Tumors für Kontroll- und Therapiebedingungen beschreibt. Durch Zytostatika bewirkte Verlaufsunterschiede lassen sich dann durch ein statistisches Testverfahren sichern und präzise darstellen.
Bisher zu wenig berücksichtigt wird in der Literatur ebenfalls die nur mäßige Korrelation zwischen Tumorgröße und Therapieeffekt. Gerade unter Zytostatikaeinwirkungen treten Gewebsnekrosen auf, die dann zystisch und ödematös degenerieren können und wegen unzureichender Resorption das Tumorvolumen auftreiben. Verlaufsmessungen des Tumorwachstums können dadurch verfälscht werden.
Wird in den bisher publizierten Therapiestudien auch kaum über den zeitlichen Ablauf zellkinetischer Veränderungen berichtet, so empfiehlt POVLSEN (67) zumindest die qualitative Analyse der pathohistologischen Veränderungen. Die von uns durchgeführte quantitative Auswertung der Mitoserate und des Mitosephasenverhältnisses erlauben nach zweifacher statistischer Testung gesicherte Aussagen über die Wirkung eines Zytostatikums. Aus Verschiebungen der Phasenverhältnisse und damit nachweisbaren Zellsynchronisationen werden Möglichkeiten für eine experimentell begründete Kombinationstherapie aufgezeigt. Nachteile dieser zellkinetischen Untersuchungen sind der relativ große Zeitaufwand und die Gefahr subjektiver Beobachtungsfehler, welche aber durch die routinemäßige Auswertung einer genügend großen Zellzahl nach standardisierten Parametern minimiert werden kann. Wir halten deshalb neben der orientierenden Analyse des Wachstumsverlaufs zellkinetische Untersuchungen zur Optimierung einer experimentell gesicherten Zytostatikatherapie für erforderlich. Zudem dient die Zellkinetik als Grundlage für weiterführende

Untersuchungen über die Veränderungen von immunologischen Eigenschaften und von Oberflächenantigenen, die ebenfalls an paraffinfixierten Gewebeschnitten durchgeführt werden können (19).

5. Zusammenfassung

Am Modell der thymusaplastischen Nacktmaus führten wir an einem xenotransplantierten, kleinzelligen Bronchialkarzinom B1 und an einem Adenokarzinom der Lunge B13 eine Zytostatikatherapie mit ADR, END, CCNU, MTX und VCR durch. Der Effekt dieses Therapieversuchs wurde mit den Parametern Tumorwachstum, Mitoseindex und Mitosephasenverhältnis gemessen. Zur Auswertung des Wachstumsverhaltens erarbeiteten wir ein mathematisches Modell, mit dem vom einzelnen Versuchstier unabhängige Start- und Testbedingungen geschaffen wurden. Es ließen sich nun Funktionen aufstellen, die das allgemeine Wachstumsverhalten der Tumoren unter Kontroll- und Therapiebedingungen beschreiben. Neben der graphischen Darstellung und Interpretation der Kurvenverläufe wurden diese im F-Test auf Signifikanz geprüft. Das kleinzellige Bronchialkarzionom wuchs unter jedem der verwendeten Zytostatika hochsignifikant langsamer als die Kontrolle. Das Adenokarzinom zeigte nur nach Endoxanapplikation eine schwach signifikante Wachstumsretardierung.

Die Ergebnisse der zellkinetischen Untersuchungen wurden im Zeitverlauf ebenfalls graphisch dargestellt und mit einem T-Test und einem Rangtest (U-Test) statistisch analysiert. MI und PhV des Tumors B 13 fielen nach Lomustinapplikation hochsignifikant ab, nach Endoxanapplikation war der gleiche Effekt schwächer ausgesprägt. Die statistisch gesicherten zellkinetischen Veränderungen des Tumors B1 unter Therapie verdeutlichten seine Chemosensibilität für alle verwendeten Zytostatika. Lomustin hatte im direkten Vergleich der Medikamente untereinander den größten Effekt. Mögliche Ursachen und eine therapeutische Nutzung des kurzzeitigen Wiederanstiegs von MI und PhV bei einigen Zytostatika wurden besprochen. Die Vorteile des von uns vorgelegten Auswertungsmodells gegenüber den publizierten Verfahren wurden im Hinblick auf klinische und weiterführende experimentelle Studien diskutiert.

6. Abbildungen

6.1 Wachstums- und Zellkinetikkurven Tumor B13

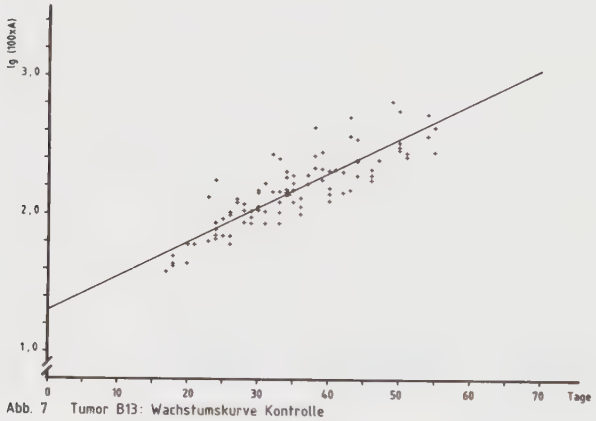


Abb. 7 Tumor B13: Wachstumskurve Kontrolle

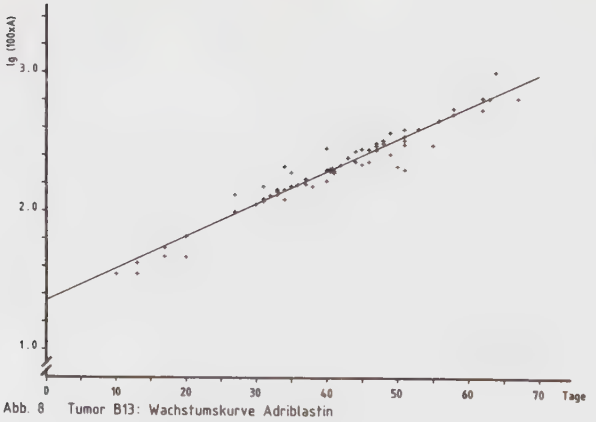


Abb. 8 Tumor B13: Wachstumskurve Adriblastin

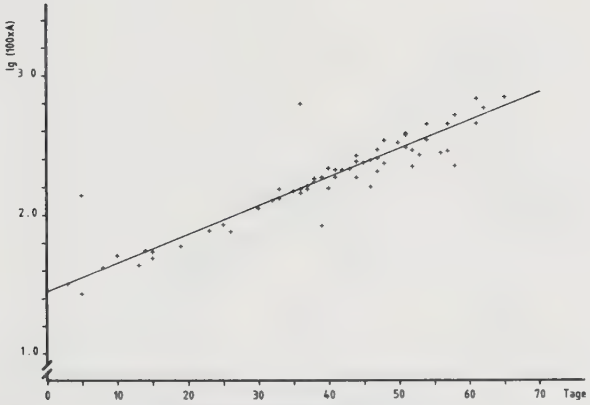


Abb. 9 Tumor B13: Wachstumskurve Endoxan

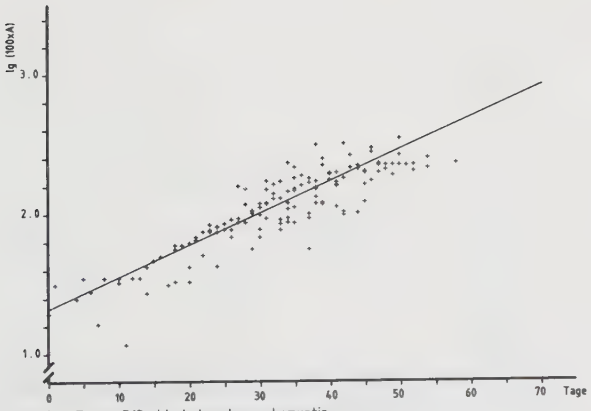


Abb. 10 Tumor B13: Wachstumskurve Lomustin

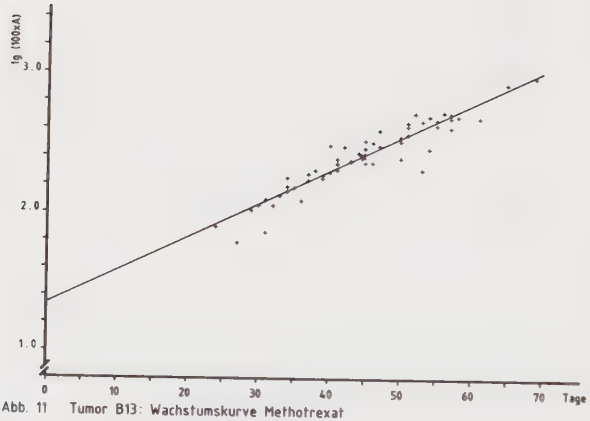


Abb. 11 Tumor B13: Wachstumskurve Methotrexat

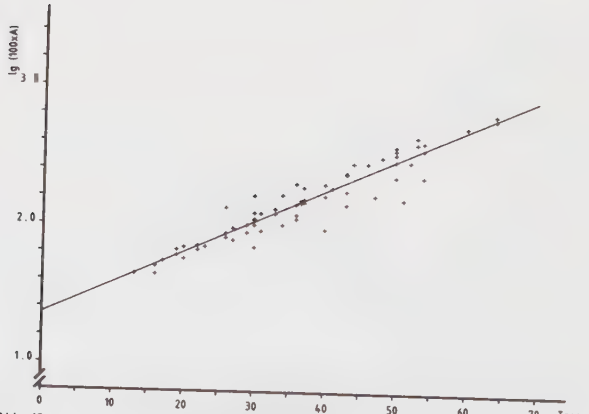


Abb. 12 Tumor B13: Wachstumskurve Vincristin

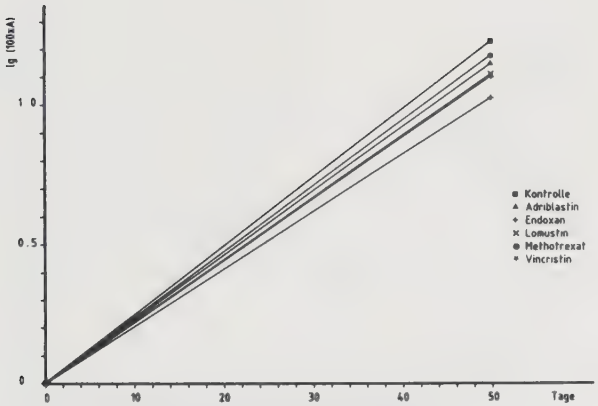


Abb. 13 Tumor B13: Zusammenstellung der Wachstumskurven

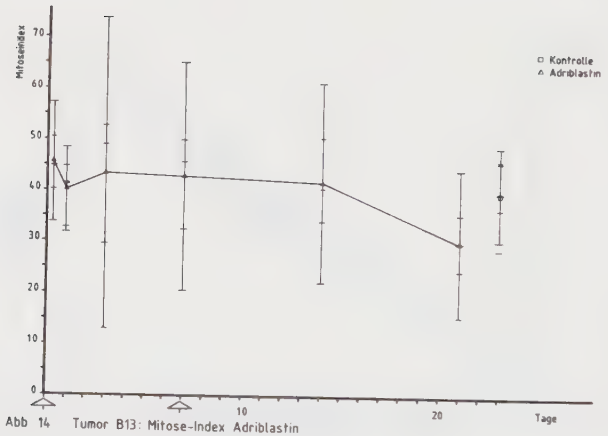


Abb 14 Tumor B13: Mitose-Index Adriblastin

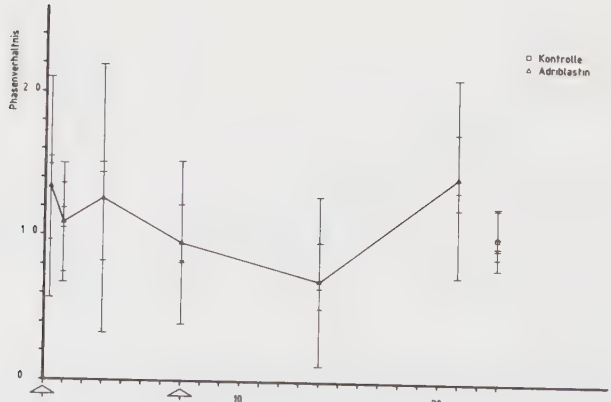


Abb 15 Tumor B13: Mitose-Phasenverhältnis Adriblastin

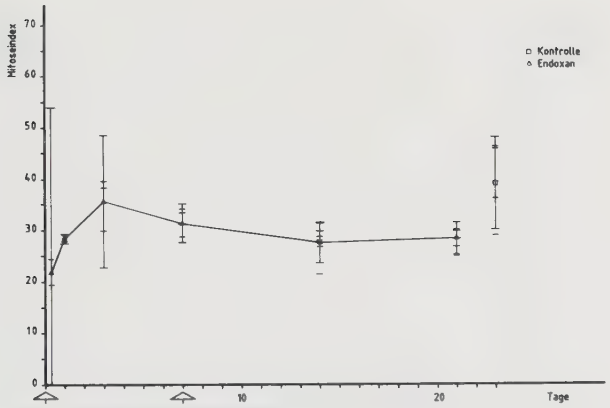


Abb. 16 Tumor B13: Mitose-Index Endoxan

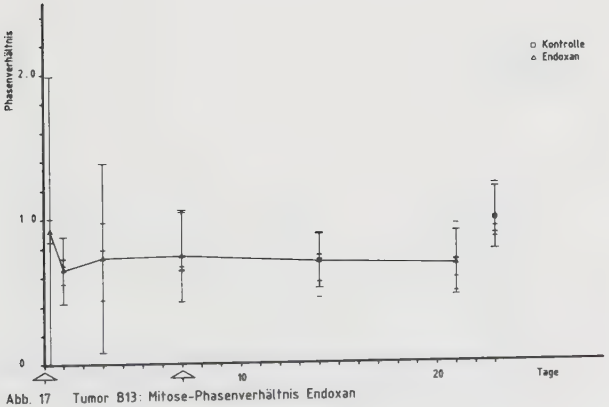


Abb. 17 Tumor B13: Mitose-Phasenverhältnis Endoxan

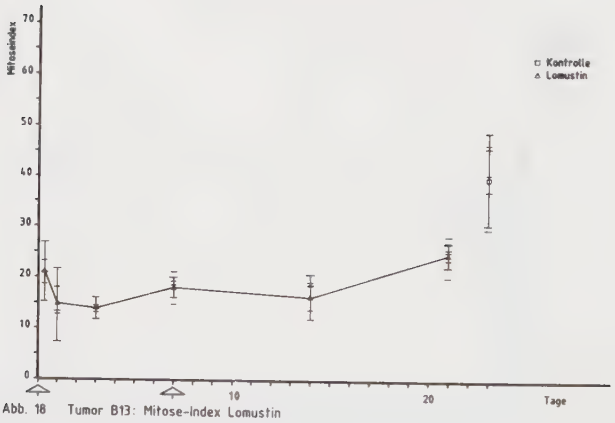


Abb. 18 Tumor B13: Mitose-Index Lomustin

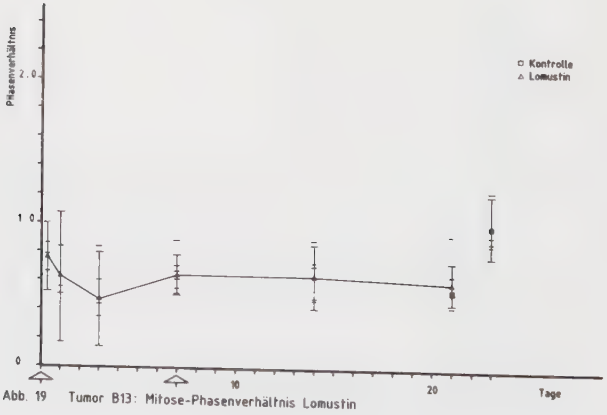


Abb. 19 Tumor B13: Mitose-Phasenverhältnis Lomustin

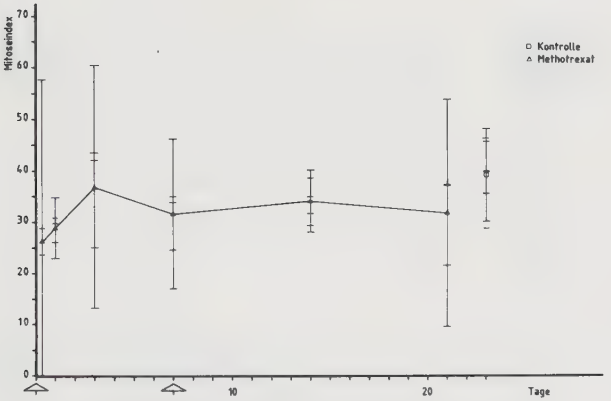


Abb. 20 Tumor B13: Mitose-Index Methotrexat

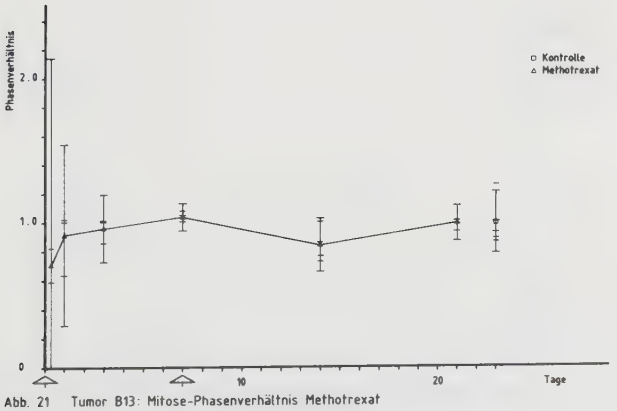


Abb. 21 Tumor B13: Mitose-Phasenverhältnis Methotrexat

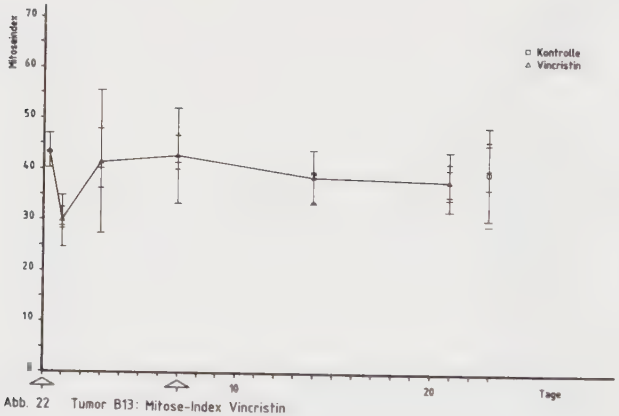


Abb. 22 Tumor B13: Mitose-Index Vincristin

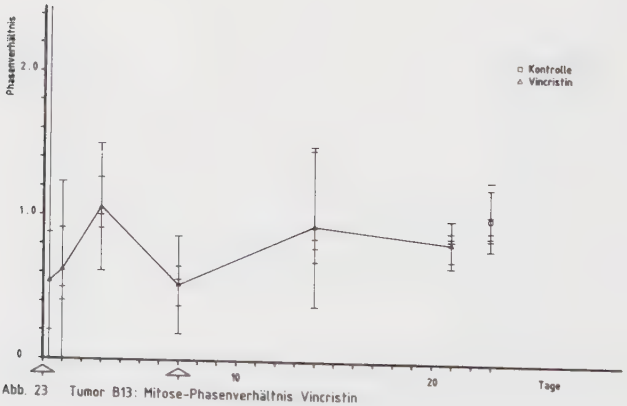


Abb. 23 Tumor B13: Mitose-Phasenverhältnis Vincristin

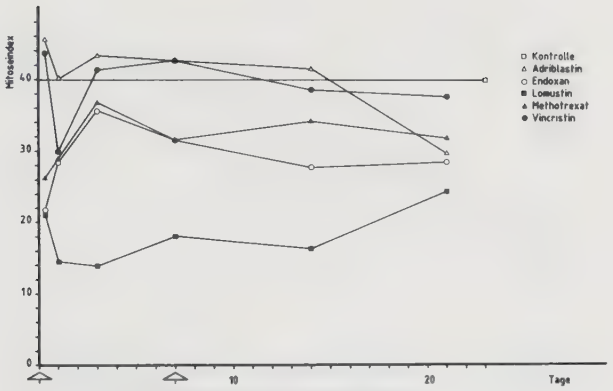


Abb. 24 Tumor B13: Zusammenstellung der Mitose-Indexkurven

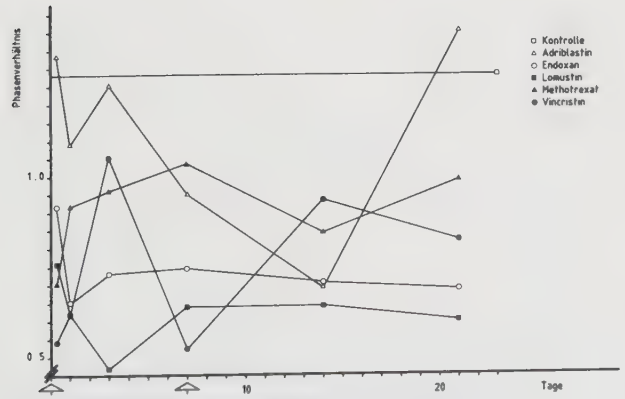


Abb. 25 Tumor B13: Zusammenstellung der Mitose-Phasenverhältniskurven

6.2 Wachstums- und Zellkinetikkurven Tumor B1

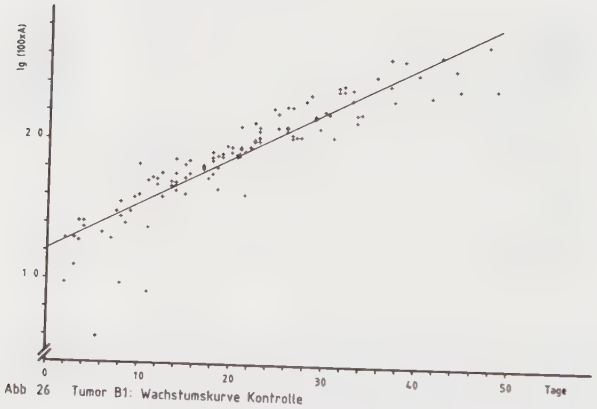


Abb 26 Tumor B1: Wachstumskurve Kontrolle

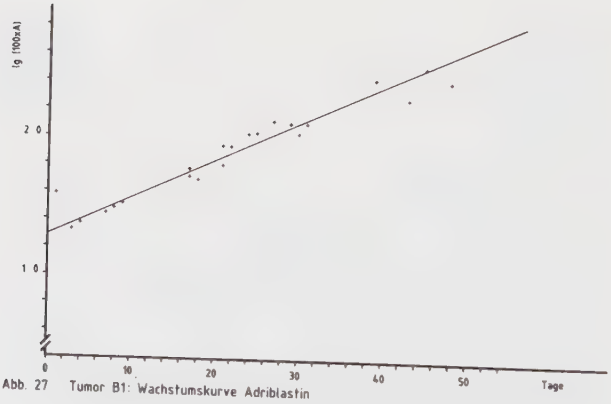


Abb. 27 Tumor B1: Wachstumskurve Adriblastin

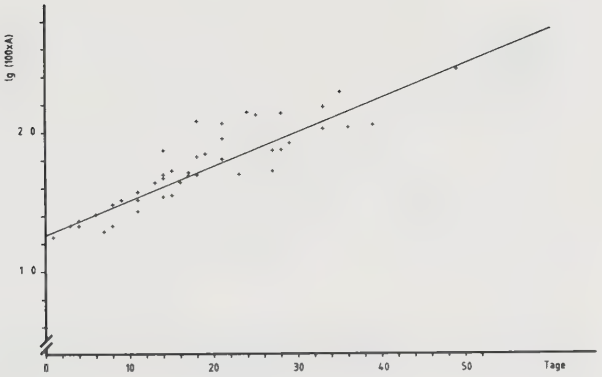


Abb. 28 Tumor B1: Wachstumskurve Endoxan

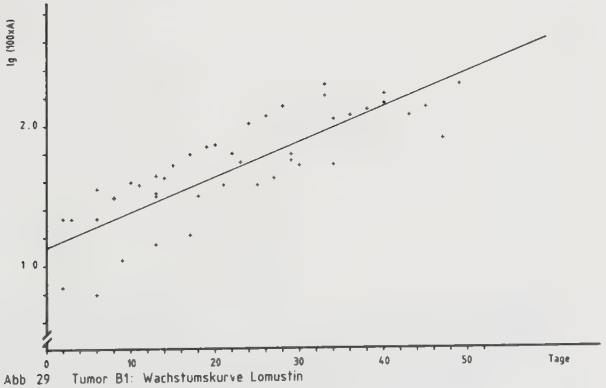


Abb 29 Tumor B1: Wachstumskurve Lomustin

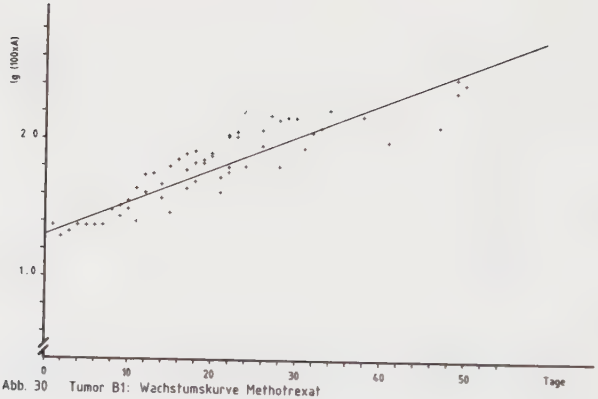


Abb. 30 Tumor B1: Wachstumskurve Methotrexat

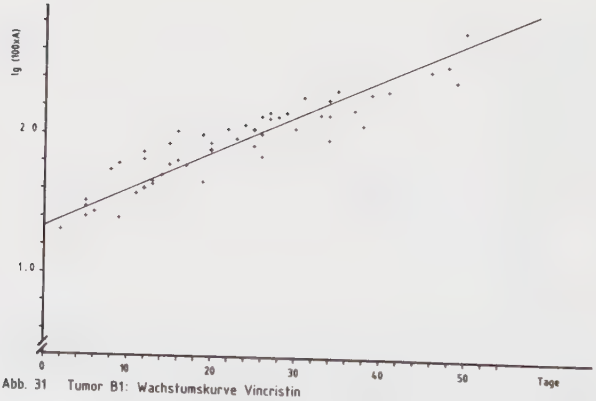


Abb. 31 Tumor B1: Wachstumskurve Vincristin

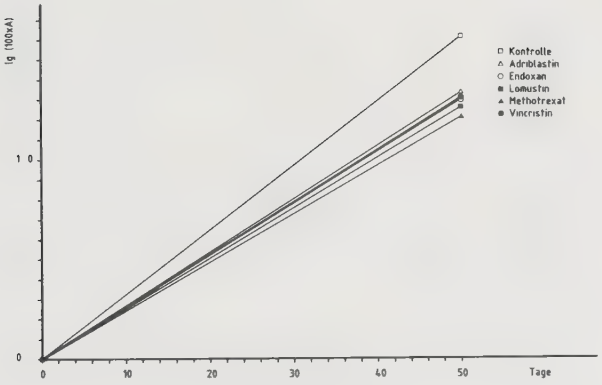


Abb. 32 Tumor B1: Zusammenstellung der Wachstumskurven

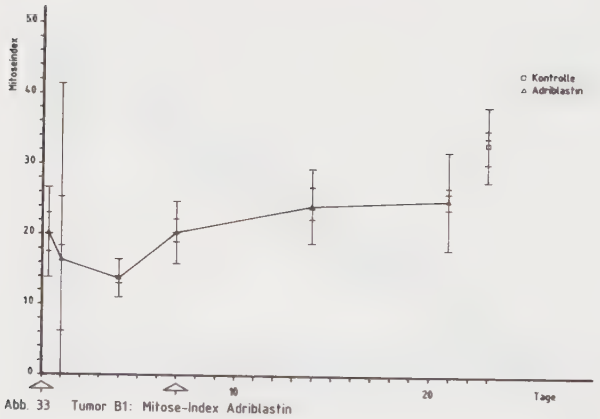


Abb. 33 Tumor B1: Mitose-Index Adriblastin

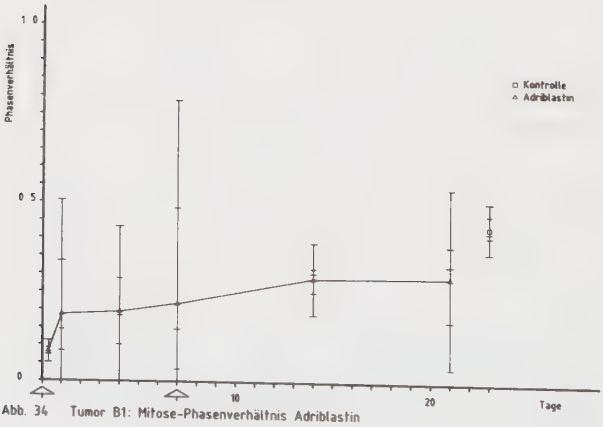


Abb. 34 Tumor B1: Mitose-Phasenverhältnis Adriblastin

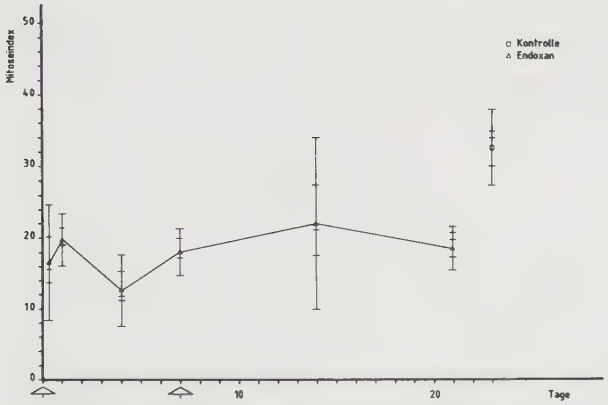


Abb. 35 Tumor B1: Mitose-Index Endoxan

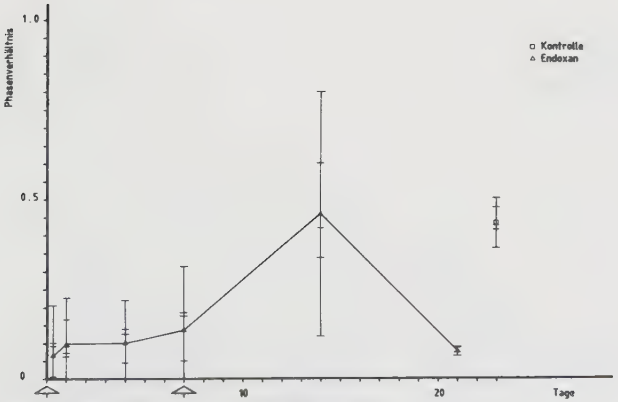


Abb. 36 Tumor B1: Mitose-Phasenverhältnis Endoxan

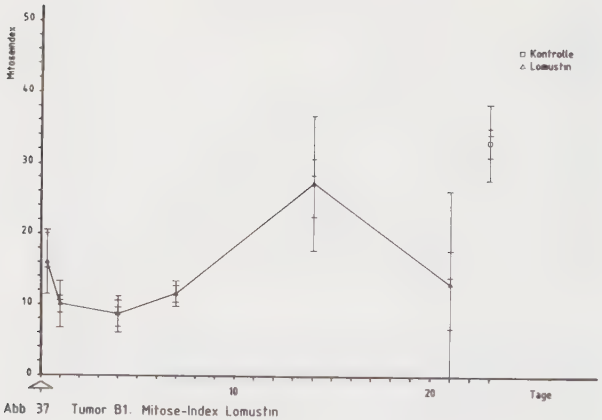


Abb 37 Tumor B1. Mitose-Index Lomustin

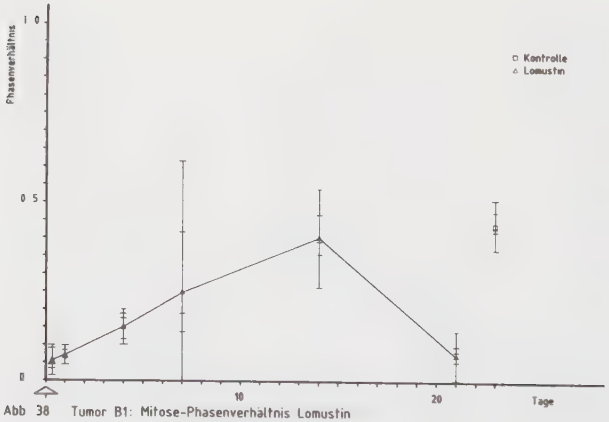


Abb 38 Tumor B1: Mitose-Phasenverhältnis Lomustin

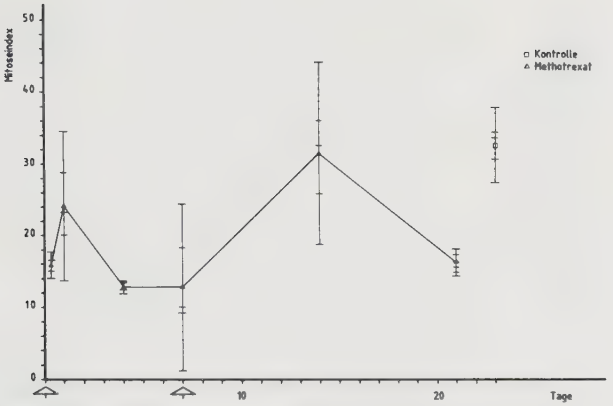


Abb. 39 Tumor B1: Mitose-Index Methotrexat

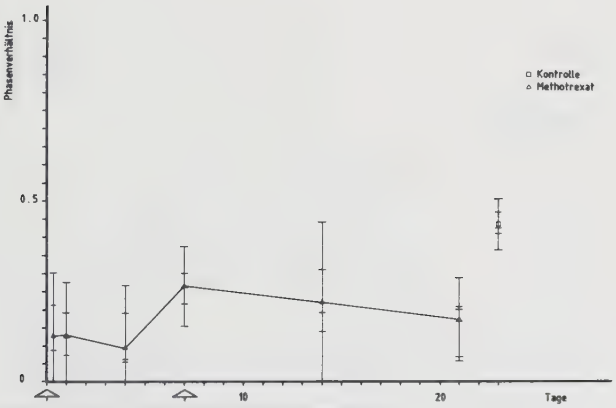


Abb. 40 Tumor B1: Mitose-Phasenverhältnis Methotrexat

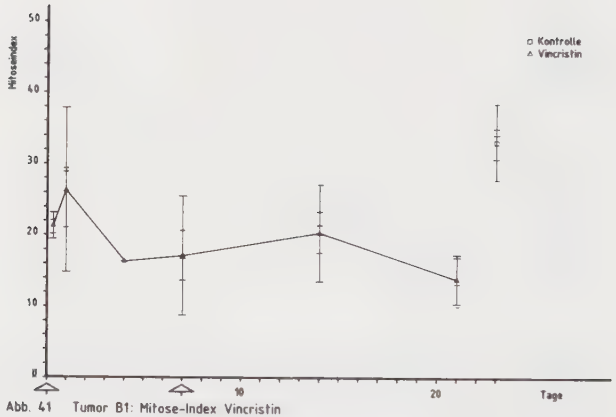


Abb. 41 Tumor B1: Mitose-Index Vincristin

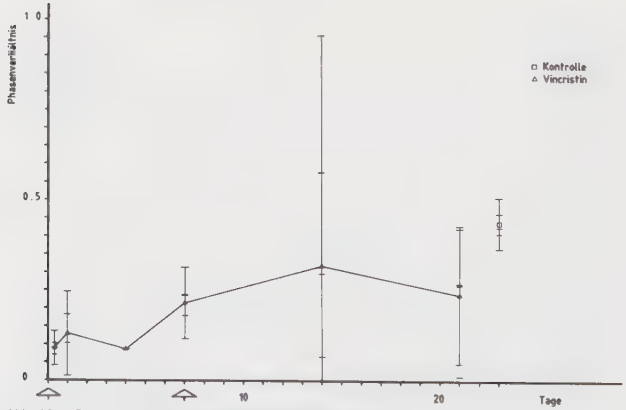


Abb 42 Tumor B1: Mitose-Phasenverhältnis Vincristin

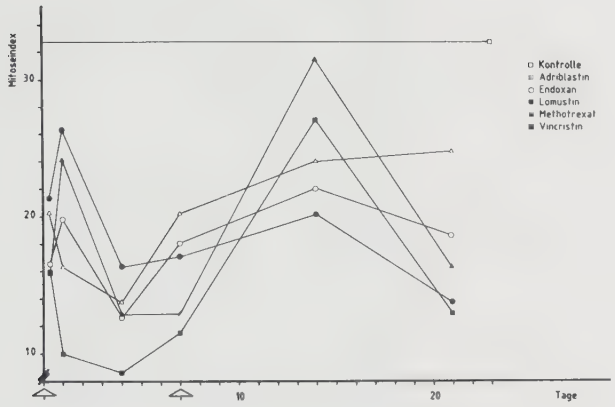


Abb 43 Tumor B1 Zusammenstellung der Mitose-Indexkurven

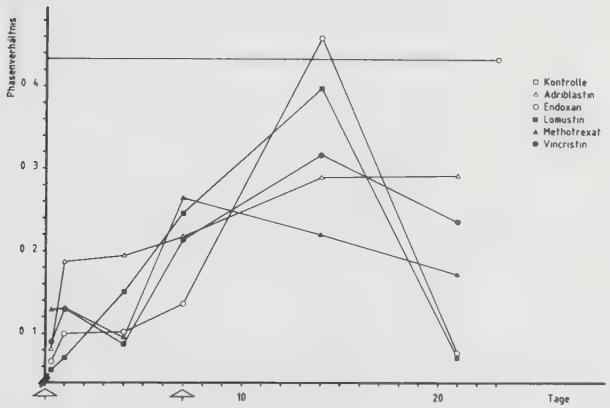


Abb 44 Tumor B1: Zusammenstellung der Mitose-Phasenverhältniskurven

7 Liste der verwendeten Abkürzungen:

A	-	dimensionsloser Flächenwert des Tumorwachstums
ACTH	-	adrenocorticotropes Hormon
ADR	-	Adriblastin
CCNU	-	Lomustin (generic name: Cyclohexylchlorethyl-nitrosourea
CEA	-	carcinoembryonales Antigen
C-Ig-Zellen	-	C-Immunglobulin-Zellen
DNA	-	Desoxyribonucleinsäure
EKG	-	Elektrokardiogramm
END	-	Endoxan
F-Test	-	statistischer Test, zum Vergleich der Wachstumsrate
G-6-PD	-	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
H_3	-	Tritium
IgA	-	Immunglobulin A
IgG	-	Immunglobulin G
IgM	-	Immunglobulin M
i.p.	-	intraperitoneal
KF	-	kritische Fläche
KG	-	Körpergewicht
LD_{50}	-	Dosis, die für 50 % der Versuchstiere letal ist
LDH	-	Lactatdehydrogenase
MI	-	Mitoseindex
MTX	-	Methotrexat
NK-Zellen	-	Natural-Killer-Zellen
PBS	-	phosphate buffered saline
p.i.	-	post injectionem
PhV	-	Mitosephasenverhältnis
p.o.	-	per os (oral)
RNA	-	Ribonucleinsäure
SPF	-	specific pathogen free
T-Lymphozyten- bzw. T-Zellen	-	thymusabhängige Lymphozyten
T-Test	-	statischer Test nach Student zum Vergleich der Zellkinetik
U-Test	-	Rang-Test nach Mann-Whitney zum Vergleich der Zellkinetik
UV	-	Ultraviolett
VCR	-	Vincristin
ZNS	-	Zentralnervensystem

8 Literaturverzeichnis

(1) Produktinformation "Adriblastin"
Farmitalia Carlo Erba, Montedison Farmaceutica

(2) ARAI, T. et al.:
HeLa cell tumor in nude mice and its response to antitumor agents
Gann 67, 493-503, Augs. 1976

(3) BADER, A. et al.:
Zum Wachstumsverhalten menschlicher Malignome nach Transplantation auf nu/nu-Mäuse
Z. Versuchstierk. 23, 161-168 (1981)

(4) BASTERT, G. et al.:
Testing of cytostatic drugs und x-ray radiation in xenotransplanted human ovarian carcinomas
in: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology, ed. by G. Bastert, G.B.A. et al., G. Fischer-Verlag, Stuttgart - New York, 125-136, 1981

(5) BASTERT, G. et al.:
Wachstum xenotransplantierter Mammakarzinome als Malignitätsparameter
Arbeitstagung "Menschliche Malignome auf nu/nu-Mäusen"
Frankfurt/Main, März 1983, Z. Versuchstierk. 25, 202, 1983

(6) BECHER, R. et al.:
Cytogenetic studies in human tumour xenografts
in: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology, ed. by G. Bastert G.B.A. et a., G. Fischer-Verlag, Stuttgart - New York, 329-334, 1981

(7) BENNER, R. et al.:
The influence of the thymus upon the number and class distribution of immunoglobulin containing cells in the bone marrow and other lymphoid organs of the mouse
Adv. Exp. Med. Biol. 114, 113-135, 1979

(8) BERENBAUM, M.C. et al.:
Br. J. Cancer 30, 13-32, 1974

(9) BISMARCK, B.L. et al.:
Reproducable metastatic growth of K-562 human myelogenous leukemia cells in nude mice
JNCL, Vol. 63, No. 2, 295-297, Aug. 1979

(10) BOGDEN, A.E. et al.:
Effect of serial passage in nude athymic mice on the growth characteristics and chemotherapy responsiveness of 13762 and 323OAC mammary tumor xenografts
Cancer research 38, 59-64, Jan. 1978

(11) BOGDEN, A.E. et al.:
A rapid screening method for testing chemotherapeutic agents against human tumor xenografts
in: Proceedings of the Symposion on the Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research, ed. by Houchens, D.P. et Ovejera, A.A., G. Fischer-Verlag, 231-250, New York 1978

(12) BOSSLET, K. et al.:
Microenvironmental influences of the expression of monoclonal antibody defined immunochemically characterized membrane associated antigens on human small cell and adenocarcinomas of the lung
Vortrag auf dem Kongress: "Oncodevelopmental Biology and Medicine" in Stockholm, Sept. 1983

(13) BRANDFORD PATTERSON, W.
Cancer Res. 28, 1637-1651, 1968

(14) BURT, F.B. et al.:
Heterotransplantation of bladder cancer in the hamster cheek pouch: in vivo testing of cancer chemotherapeutic agents
J. Virol 95: 51-57 (9166)
(15) CARTER, S.K., BAKOWSKI, M.T., HELLMANN, K.
Chemotherapy of cancer
John Wiley and Sons, New York - London - Sydney - Toronto
(16) Produktinformation "CeCeNu"
medac GmbH
(17) DAVY, M. et al.:
Heterologous growth of human ovarian cancer
Acta Obstet Gynecol Scand 56, 55-59 (1977)
(18) DIPERSIO, C.P.
Regional growth differences of human xenografts in nude mice
Laboratory Animals, 179-180, 1981
(19) DORSETT, B.H. et JOACHIM, H.L.
A method for the use of immunofluorescence on paraffinembedded tissues
A.J.C.P., Vol. 69, Nr. 1, 66-72, Jan. 1978
(20) ECKHARDT, SS.
Future clinical perspective: a concluding discussion,
Antibiotics chemother., Vol. 28, 147-152 (Karger, Basel 1980)
(21) Produktinformation "Endoxan"
Asta-Werke AG
(22) ERICKSON, L.C. et al.:
Differential repair of
1-(2-Chlorethyl)-3-(-4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea induced DNA damage in two human colon tumor lines
Cancer Research, 38, 802-808, March 1978
(23) FIEBIG, H.H. et al.:
Vergleich des chemotherapeutischen Ansprechens eines Tumors im Patienten und in der Maus,
Arbeitstagung "Menschliche Malignome auf nu/nu-Mäusen"
Frankfurt/Main, März 1983, Z. Versuchstierk. 25, 205, 1983
(24) FLANAGAN, S.P.
"nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse
Genet. Res. (camb.), 8, 295-309, 1966
(25) FODSTAD, O. et al.:
Assessment of tumor growth and of response to chemotherapy of human melanomas in athymic nude mice
Br.J. Cancer, 41, Suppl. IV, 146-149, 1980
(26) FODSTAD, O. et al.:
Response to chemotherapy of human malignant melanoma xenografts in athymic nude mice
Int. J. Cancer: 25, 435-458 (1980)
(27) FOGH, J. et al.:
Analysis of human tumor growth in nude mice
in: Proceedings of the Third International Workshop on Nude Mice, G. Fischer-Verlag, New-York, 447-456, 1982
(28) FREEDMAN, V.H. et al.:
Mass production of animal cells in nude mice with retention of cell specific markers
Exptl. Cell Res., 98, 143-151, 1976
(29) FUJITA, M. TAGUCHI, T.
Comparison between the chemotherapy of human cancer xenografts in nude mice and the clinical responses observed in the donor patients
in: Proceedings of the Third International Workshop on Nude Mice, G. Fischer-Verlag, New York, 621-629, 1982

(30) FUJITA, M.
Relationship of chemotherapy on human cancer xenografts in nude mice to clinical response in donor patient.
Journal of Surgical Oncology 15, 211-219 (1980)
(31) GERSHWIN, M.E. et al:
Immunbiology of heterotransplanted human tumors in nude mice
J. Nat. Cancer Inst. Vol. 58, Nr. 5, 1455, 5(1977
(32) GIOVANELLA, B.C., FOGH, J.
Present and future trends in investigations with the nude mouse as a recipient of human tumor transplants,
in: The nude mouse in experimental and clinical research ed. by Fogh, Giovanelle, Academic Press, 281-312, New York - San Franzisko - London, 1978
(33) GIOVANELLA, B.C. et a.:
Heterotransplantations of human cancer into nude mice
Cancer 42: 2269-2281, 1978
(34) GIOVANELLA, B.C. et al.:
I. Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymusless mice
II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors
J. Ntl. Cancer Inst. Vol. 52, Nr. 3, 921, März 1974
(35) GIOVANELLA, B.C. et al.:
Serial transplantation of human malignant tumors in nude mice and their use in experimental chemotherapy
in: Proceedings of the Symposion an the Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research, ed. by Houchens, D.P. et Ovejera, A.A., G. Fischer-Verlag, 163-179, New York 1978
(36) GOLDIN, A., JOHNSON, R.K
Resistance to antitumor agents
in: Recent Advances in Cancer Treatment (eds. Tagnon, H.J. and Staquet, M.J.), Raven Press, 155, New York (1977)
(37) GREENE, H.S.
Science 88, 357-358, 1938
(38) HELSON, L.
Investigational chemotherapy of neuroblastoma
Vol. 66, no. 3, Florida, M.A./ 284-287, March 1973
(39) HEPPNER, G.H. et al.:
Heterogeneity in drug sensivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor
Cancer Research 38, 3758 (1978)
(40) HOPKINS, W.J.
Restoration of suppressor function in athymic mice
Immunology 34, 309 (1978)
(41) HOUCHENS, D.P. et al.:
Toxicity of cancer chemotherapeutic agents in athymic (nude) mice.
Cancer Treatment Reports, Vol. 61, No. 1, 103-104, Jan./Feb. 1977
(42) HUCK, R. et al.:
Human cervix carcinoma after xenotransplantation into nu/nu mice
in: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology, ed. by Bastert G.B.A. et al., G. Fischer-Verlag, 77-84, Stuttgart - New York 1981
(43) ISAACSON, J.H. CATTANACH, B.M.
Report mouse news letter 27, 31, 1962
(44) JACOBSEN, G.K. et al.:
Effects of thymus grafts in nude mice transplanted with human malignant tumors
Expl. Cell Biol. 47, 409-429 (1979)

(45) KINDRED, B.
T cell functions in nude mice
in: 4th international workshop on immune-deficient animals in experimental research, ed. by Sordat, B., Karger 306, 1982
(46) KLOPF, M., M. STARK, A. SPIETH, H.-W. SCHLIPKÖTER
Growth behaviour of a human bronchogenic adenocarcinoma during cytostatic therapy in the nude mouse
Arbeitstagung "Menschliche Malignome auf nu/nu-Mäusen
Frankfurt/Main, März 1983, Z. Versuchtierk. 25, 211, 1983
(47) Kollegium Biomathematik NW
Biomathematik für Mediziner, Springer Verlag, 161-167, Berlin - Heidelberg - New York 1976
(48) KRAUSE, P.H. et al.:
Xenotransplantation etablierter Tumorzellen auf kongenital thymuslose "nude" Mäuse
Z. Krebsforschung 83, 177-186 (1975)
(49) KUBOTA et al.:
Experimental chemotherapy of carcinoma of human stomach and colon serially transplanted in nude mice
Gann 69, 299-309 (June 1978)
(50) KUNSTYR, I.
Infektiöse Erkrankungen thymus-aplastischer Mäuse
Vortrag, gehalten auf: Symposium über thymusaplastische Nacktmaus (nu/nu) und Nacktratte (rnu/rnu). Zucht, Haltung, Ernährung, Versuchsmodelle. (26./27. Feb. 1981, Dettmold)
aus gleichnamigem Sonderdruck, 21-26, 1981
(51) KYNAZIS, A.P. et al:
Biological behaviour of human malignant tumors grown in the nude mouse
Cancer Research 41, 3395-4000, Oct. 1981
(52) LEFKOVITS, I.
The nude mouse in retrospect
in: Proceedings of the Second International Workshop on Nude Mice, University of Tokyo Press, Tokyo;
G. Fischer-Verlag, 557-568, Stuttgart - New York 1977
(53) LINDENBERGER; J.
Aspects of xenografted tumors of the ear, nose and throat, morphology, cell kinetics, growth behaviour and immunology
aus: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology, ed. by Bastert, G.B.A. et al., G. Fischer-Verlag, 451-466, Stuttgart - New York 1981
(54) LISS et al.
Z. Krebsforschung 80, 239-245, 1973
(55) LLOYD, H.H.
Estimation of tumor cell kill from Gompertz growth curves
Cancer Chemotherapy Rep. 59, 267-277, 1975
(56) LOOR, F.
The abnormal differentiation of the T-lymphoid system in the congenitally athymic (nude) mouse
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 128C, 719-729, 1977
(57) MATTERN, J. et al.:
Different growth rates of lung tumours in man and their xenografts in nude mice
Eur. J. Cancer, 16 (2), 289-291, Feb. 1980
(58) MATTHEWS, M.J.
Effects of therapy on the morphology and behavior of small cell carcinoma of the lung - a clinico-pathologic study
in: Lung Cancer: Progress in therapeutic research (eds. F. Muggia and M. Rozencweig) Raven Press, 155, New York 1979

(59) Produktinformation "Methotrexat Lederle"
Cyanamid GmbH 1978
(60) MÜLLER, W.E.G.
Chemotherapie von Tumoren,
Biochemische Grundlagen, Verlag Chemie 1975
(61) OKSALA, T., E. THERMAN
Mitotic abnormalities and cancer
in: Chromosomes and cancer, ed. by German, J., John Wiley and Sons, 240-263, 1974
(62) OSIEKA, R. et a.:
Chemotherapy of human colon cancer xenografts in athymic nude mice
Cancer 40, 2640-2650 (1977)
(63) PANTELOURIS, E.M.
Nature (London) 217, 370, 1968
(64) PARKER, J.W. et al.:
Spontaneous neoplasms in aged athymic (nude) mice
in: Proceedings of the Third International Workshop on Nude Mice, G. Fischer-Verlag, 347-357, New York 1982
(65) POLLACK, V.A. et al.:
Use of young nude mice for selection of subpopulations of cells with increased metastatic potential from nonsyngeneic neoplasms
JNCI, 69, 137-141, 1982
(66) POVLSEN, C.O.
A study of human tumours growing in nude mice
G. Fischer-Verlag, 127-131, New York, 1978
(67) POVLSEN, C.O.:
Status of chemotherapy, radiotherapy, endocrine therapy and immunotherapy studies of human cancer in the nude mouse
in: The nude mouse in experimental und clinical research, ed. by Fogh J. et Giovanelle, B.C.
Academic Press, 437-456, New York - San Franzisko - London 1978
(68) POVLSEN, C.O. et al.:
Growth patterns and chromosome constitutions of human malignant tumours after long-term serial transplantation in nude mice,
Acta path, microbiol. scand. Sect. A, 83, 709-716, 1975
(69) POVLSEN, C.O.
Growth of human tumors in nude mice and chemotherapy studies in this model
Proceedings of the symposion on the use of athymic (nude) mice in cancer research, ed. by Hochens, D.P. et Ovejera, A.A., G. Fischer, 187-194, New York inc. 1978
(70) POVLSEN, C.O.
Heterotransplantation of human gastrointestinal tumours of nude mice
in: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in clinical Oncology, ad. by Bastert, G.B.A. et al., G. Fischer-Verlag, 307-315, Stuttgart - New York 1981
(71) POVLSEN, C.O. RYGAARD, J.
Effects of cyclophosphamide (Endoxan) on an Burkitt's lymphoma serially grown in nude mice
Proceedings of the First International Workshop on Nude Mice, G. Fischer-Verlag, 285-292, Stuttgart - New York 1974
(72) PRITCHARD; H., MICKLEM, H.S.
The nude mouse as a model of thymus and T-Lymphocyte deficiency
in: Proceedings of the First International Workshop on Nude Mice, (Rygaard, J., Povlsen, C.O. (Eds.), 127-138, Fischer-Verlag, 1974
(73) REED, N., MANNING, D.D.
Present status of xeno-transplantations of non-malignant tissue to the nude mouse

in: The Nude Mouse in Experimental und clinical Research (J. Fogh and B.C. Giovanella, EDS.) Academic Press, 167-185, Inc. New York, San Franzisko, London, 1978

(74) ROMEIS, B.
Mikroskopische Technik, Astra-Blau Färbung,
R. Oldenbourg-Verlag, 16. Aufl. 360, München - Wien 1968

(75) RYGAARD, J.
Thymus and self. Immunobiology of the mouse mutant nude
F.A.D.L. Publishers, Copenhagen and J. Wiley und sons, London, 1973

(76) RYGAARD, J., POVLSEN, C.O.
Heterotransplantation of a human malignant tumor to the mouse mutant nude
Acta path. microbiol. Scand. 77, 758, 1969

(77) RYGAARD, J. POVLSEN, C.O.
The absence of spontaneous tumors in nude mice
in: Proceedings of the First International Workshop on Nude Mice, G. Fischer-Verlag, 293-296, Stuttgart - New York 1974

(78) SCHMITZ, R. et al.
Adjuvante Chemotherapie humaner kolorektaler Adeno-Carcinome nach Wachstum auf kongenital thymusdysplastischen Mäusen "Nude"
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 96, 269-279, 1980

(79) SHARKEY, F.E., BAINS-GREBNER, M.
Increased mitotic activity in human tumors transplanted to athymic nude mice
in: Proceedings of the Third International Workshop on nude mice, G. Fischer-Verlag, 457-462, New York 1982

(80) SHARP, A.K., COLSTON U.J.
Elevated macrophage activity in nude mice
in: 4th international workshop on immune-deficient animals in experimental research, ed. by Sordat, B., Karger, 309, 1982

(81) SHIMASOTO, Y. et al.:
Transplantation of human tumors in nude mice
J. Natl. Cancer Inst. Vol. 56, No. 6, 1251ff, June 1976

(82) SHIMOSATO, Y. et al.:
Experimental chemotherapy on human tumors transplanted in nude mice, with particular reference to evaluation of results by tumor products
in: Proceedings of the Symposion on the Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research, ed. by Houchens, D.P. et Ovejers, A.A., G. Fischer-Verlag, 196-205, New York 1978

(83) SHIN, S.I.:
Use of nude mice for tumorigenicity testing and mass propagation
Methods Enzymol 58: 370-379, 1979

(84) SHIN, S., FREEDMAN, V.H.
Neoplastic growth of animal cells in nude mice
in: Proceedings of the Second International Workshop on Nude Mice, University of Tokyo Press, Tokyo; G. Fischer-Verlag, 237, 249, Stuttgart - New York 1977

(85) SHORTHOUSE, A.J. et al.:
The chemotherapy of bronchial carcinoma xenografts in relation to patient response
in: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology, ed. by Bastert G.B. Bastert et al., G. Fischer-Verlag, 355-371, Stuttgart - New York 1981

(86) SIMON, R.S. et al.:
Thymus independent host restistance against the growth and metastases of allogeneic and xenogeneic tumors in nude mice
in: Proceedings of the Third International Workshop on Nude Mice, G. Fischer-Verlag, 379-389, New York 1982

(87) SLAGEL, D.E. et al.:
Phenotypic character of serially heterotransplanted tumors in athymic nude mice
in: Proceedings of the Third International Workshop on nude mice
G. Fischer-Verlag, 589-590, New York 1982
(88) SORDAT, B.
Morphological and functional evaluation of human solid tumours serially transplanted in nude mice
in: Proceedings of the First International Workshop an Nude Mice, G. Fischer-Verlag, 269-277, Stuttgart-New York, 1974
(89) SPIETH, A., M. STARK, M. KLOPF, H.W. SCHLIPKÖTER
Evalutation of the chemotherapy study of a small cell carcinoma of the lung (SCCL) serially heterotransplanted in nude mice
Arbeitstagung "Menschliche Malignome auf nu/nu-Mäusen" Frankfurt/ Main, März 1983, Z. Versuchstierk. 25, 216, 1983
(90) STAAB, H.J. et al.:
Induktion eines neoplastischen Wachstums von Nacktmausfibroblasten durch humane xenotransplantierte Karzinomgewebe,
Arbeitstagung "Menschliche Malignome auf nu/nu-Mäusen"
Z. Versuchstierk. 25, 217, Frankfurt/Main 1983
(91) STARK, M., SCHLIPKÖTER, H.W.
The heterogeneity of human bronchogenic carcinomas in in-vitro und in vivo-models of the nu/nu mouse and rnu/rnu rat
aus: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology, ed. by Bastert G.B.A. et al., G. Fischer-Verlag, 343-349, Stuttgart - New York 1981
(92) STARK, M.,
Broncogenic carcinomas in athymic animals
in: G.B.A. Bastert et al. (eds.): Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology, G. Fischer Verlag, Stuttgart, 337-341, New York 1981
(93) STARK, M., SCHLIPKÖTER, H.W.
Xenotransplants of human carcinomas: changes of properties in short term and long term passages,
Arbeitstagung "Menschliche Malignome auf nu/nu-Mäusen" Frankfurt/ Main, Z. Versuchstierk. 25, 218, März 1983
(94) STEEL, G.G.
Cytokinetics of neoplasia
in: Growth Kinetics of Tumors, Clarendon Press, Engl., 125-139, 1977
(95) THOMSON, D.M. et al.;
Human cancers transplanted in nude mice retain the expressions of their organspecific neoantigens
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., Vol. 17, No. 11, 1191-1197 (1981)
(96) TODSTAD, Q.
Cancer, 41, 829, 1980
(97) THOR, N.M. STARK, A. SPIETH, M. KLOPF, B. HILSCHER, H.W. SCHLIPKÖTER
Cell kinetic examinations of human carcinomas heterotransplanted in nude mice
aus: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncologiy, ed. by Bastert G.B.A. et al., G. Fischer-Verlag, S. 351-357, Stuttgart - New York 1981
(98) TUBIANA, M., MALAISE, E.P.
Combination of radiotherapy and chemotherapy: implications derived from cell kinetics
in: Lung Cancer: Progress in therapeutic Research, (Eds.) Muggia, F. and Rozencweig, Raven Press, 51-61, New York 1979
(99) Produktinformation "Vincristin"
Eli Lilly GmbH

(100) WYNN-WILLIAMS, A., Mc CULLOCH, P.
Human cancer and other transplants in the "nude" mouse
J. Path. Vol. 122, 225-228, 1977

(101) ZENNER, H.P. et al.:
Malignant potency and antigenetic properties of cultured larynx carcinoma cells after transplantations in athymic mice in: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology,
ed. by Bastert, G.B.A. et al.: G. Fischer-Verlag, 473-477, Stuttgart - New York 1981

Lebenslauf von Markus Klopf

5. 7. 1957	geboren in Düsseldorf als Sohn des kaufm. Angestellten August Klopf und seiner Ehefrau Agnes, geb. Fachenbach Konfesssion: röm.-kath.
1964 - 1967	Besuch der kath. Volksschule an der Kirchfeldstraße, Düsseldorf
1967 - 1976	Besuch des Städt. Görresgymnasiums, Königsallee, Düsseldorf
1976	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Görresgymnasium
1976 - 1982	Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf
Januar 1979	Beginn mit den experimentellen Arbeiten zu meiner Dissertation am Institut für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf
Okt. 1981 - Sept. 1982	Praktisches Jahr im Evangelischen Krankenhaus in Mülheim/Ruhr, Wahlfach: Gynäkologie
Oktober 1982	Bestehen der Ärztlichen Prüfung
November 1982	Approbation als Arzt
seit Dezember 1982	Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung des Liebfrauen-Krankenhauses in Düsseldorf

Lebenslauf von Annette Spieth

4. 9. 1956	geboren in Düsseldorf als Tochter des Oberamtsrats Helmut Spieth und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Risse Konfession: evang.
1963 - 1966	Besuch der Gemeinschaftsschule, Jahnstraße, Ratingen
1966 - 1974	Besuch des Geschwister-Scholl-Gymnasiums, Ratingen
1974 - 1976	Besuch des Theodor-Fliedner-Gymnasiums, Düsseldorf-Kaiserswerth
1976	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Theodor-Fliedner-Gymnasiums
1976 - 1981	Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf
Januar 1979	Beginn mit den experimentellen Arbeiten zu meiner Dissertation am Institut für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf
Okt. 1981 - Sept. 1982	Umimmatrikulation an die Universität Essen, Praktisches Jahr in den Städt. Kliniken Duisburg, Kalkweg, Wahlfach: Neurologie
November 1982	Bestehen der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Ärztin
Januar - März 1983	Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesie des Franziskus-Krankenhauses in Essen-Bedingrade
seit April 1983	Assistenzärztin in der Abteilung für Kinderheilkunde des St. Vinzenz-Hospitals in Dinslaken

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H.-W. Schlippköter danken wir für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Arbeitsplätze im Medizinischen Institut für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf.

Frau Dipl. Biochem. Dr. rer. nat. M. Stark gilt unser besonderer Dank für ihre unmittelbare Betreuung und unermüdliche Unterstützung. Durch ihre wertvollen Anregungen und ihre großzügige Förderung unserer Untersuchungen hat sie uns bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr geholfen.

Frau Dipl. Biol. B. Molik danken wir für ihre geduldige und freundliche Hilfestellung bei der statistischen Auswertung unserer Experimente.